

**SfbI, Fibronectin bindendes Protein von
Streptococcus pyogenes :
Vielversprechender Impfstoffkandidat und mukosales Adjuvans**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Kai Schulze

aus Wolfsburg

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Referent: | Prof. Dr. Kenneth N. Timmis |
| 2. Referent: | Prof. Dr. Jürgen Wehland |
| eingereicht am: | 27.08.2001 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 12.12.2001 |

The History of Medicine

- 2000 B.C. – Here, eat this root
1000 A.D. – That root is heathen. Here, say this prayer.
1850 A.D. – That prayer is superstition. Here, drink this potion.
1920 A.D. – That potion is snake oil. Here, swallow this pill.
1945 A.D. – That pill is ineffective. Here, take this penicillin.
1955 A.D. – Oops....bugs mutated. Here, take this tetracycline.
1960-1999 – 39 more "oops"...Here, take this more powerful antibiotic.
2000 A.D. – The bugs have won! Here, eat this root.

— Anonymous

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Prof. Dr. K. N. Timmis, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schulze, K., Medina, E., Talay, S.R., Towers, R.J., Chhatwal, G.S. and Guzmán, C.A. (2001) Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for elicitation of a protective immune response. Infect. Immun. 69:622-5.

Paglia, P., Terrazzini, N., Schulze, K., Guzmán, C.A. and Colombo, M.P. (2000) In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated Salmonella as oral vectors for targeted gene delivery. Gene Ther. 7(20):1725-30.

Medina, E., Schulze, K., Chhatwal, G.S., Guzmán, C.A. (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')(2) fragment. Infect. Immun. 68(8):4786-8

Tagungsbeiträge

Schulze, K.: SfbI Protein: Promising protective antigen for vaccine formulations against *S. pyogenes*. 5. Borsteler Pathogenitätsgespräche, Forschungszentrum Borstel (2000)

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung | 5 |
| I Einleitung | 7 |
| 1. Infektionskrankheiten | 7 |
| 2. <i>Streptococcus pyogenes</i> | 8 |
| 3. Impfung | 10 |
| 4. Virulenzfaktoren | 12 |
| 5. SfbI | 12 |
| 6. Ziele der Arbeit | 14 |
| II Material und Methoden | 15 |
| 1. Bakterienstämme, eukaryontische Zelllinien, Tiere und Plasmide | 15 |
| 1.1 Bakterienstämme | 15 |
| 1.2 Eukaryontische Zellen | 15 |
| 1.3 Tiere | 15 |
| 1.4 Plasmide | 15 |
| 2. Chemikalien, Enzyme und andere Materialien | 16 |
| 2.1 Chemikalien | 16 |
| 2.2 Membranen | 17 |
| 2.3 Enzyme | 17 |
| 2.4 Kommerzielle Kits | 17 |
| 2.5 Kommerzielle Antikörper und Seren | 18 |
| 2.6 Nicht-kommerzielle Antikörper und Seren | 18 |
| 2.7 Oligonukleotide | 19 |
| 3. Nährmedien, Supplemente, Lösungen und Puffer | 19 |
| 3.1 Nährmedien für Bakterien | 19 |
| 3.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen | 20 |
| 3.3 Antibiotika | 20 |
| 3.4 Lösungen und Puffer | 20 |
| 4. Kultivierung und Lagerung von Zellen | 21 |
| 4.1 Kultivierung und Stammkonservierung von Bakterien | 21 |
| 4.2 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen | 21 |
| 5. Arbeiten mit DNA | 22 |
| 5.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA | 22 |
| 5.1.1 Mini- und Midipräparation von Plasmiden | 22 |
| 5.1.2 Entsalzung mittels Dialyse | 22 |
| 5.2 Analyse von DNA-Präparationen | 23 |
| 5.2.1 Agarose-Gelelektrophorese (AGE) | 23 |
| 5.2.2 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten | 23 |
| 5.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten | 23 |
| 5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA | 23 |
| 5.3 Modifizierung von DNA | 24 |
| 5.3.1 Restriktionsverdau | 24 |
| 5.3.2 Dephosphorylierung von DNA | 24 |
| 5.3.3 Reinigung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion | 24 |
| 5.3.4 Ethanol-Präzipitation | 24 |
| 5.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten | 24 |
| 5.4 Herstellen und Transformation elektrokompeter Zellen | 25 |
| 5.5 Polymerase-Chain Reaction (PCR) | 25 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.5.1 | PCR und Kolonie-PCR..... | 25 |
| 5.5.2 | Klonierung von PCR-Produkten | 26 |
| 5.6 | DNA-Sequenzierung mittels Dye Terminator Cycle Sequencing..... | 26 |
| 6. | Arbeiten mit Proteinen..... | 27 |
| 6.1 | Isolierung von His-Tag-Fusionsproteinen..... | 27 |
| 6.2 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | 28 |
| 6.2.1 | Biochemische Quantifizierung..... | 28 |
| 6.2.2 | Abschätzung im SDS-Polyacrylamidgel | 28 |
| 6.3 | Nachweis von Proteinen..... | 28 |
| 6.3.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 28 |
| 6.3.2 | Coomassie-Färbung..... | 30 |
| 6.3.3 | Western Blot Analyse..... | 30 |
| 7. | Immunologische Methoden | 31 |
| 7.1 | Immunisierung von Mäusen..... | 31 |
| 7.1.1 | Immunisierung zur Charakterisierung der Immunantwort..... | 31 |
| 7.1.2 | Immunisierung zur Analyse der Effizienz der mukosalen Impfung | 31 |
| 7.2 | Prozessieren der Mäuse..... | 32 |
| 7.2.1 | Markierung der Mäuse | 32 |
| 7.2.2 | Blutabnahme..... | 32 |
| 7.2.3 | Isolierung von Milz und Lymphknoten der Maus..... | 33 |
| 7.2.4 | Lungenwaschung..... | 33 |
| 7.3 | Immunochemische Techniken..... | 34 |
| 7.3.1 | T-Zell-Proliferations-Assay..... | 34 |
| 7.3.2 | Deletion distinkter Zellpopulationen aus Zellgemischen..... | 34 |
| 7.3.3 | Zytotoxizitäts-Assay (CTL) | 35 |
| 7.3.4 | Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA) zur Bestimmung Antigen-spezifischer IgG, IgA und IgM | 35 |
| 7.3.5 | ELISA zur Bestimmung und Quantifizierung Antigen-spezifischer IgG-Isotypen | 36 |
| 7.3.6 | ELISA zur Quantifizierung Antigen-spezifischer IgA in Lungenwaschungen..... | 37 |
| 7.3.7 | ELISA zur Bestimmung Peptid-spezifischer IgG | 37 |
| 7.3.8 | Antikörperbindungstest | 38 |
| 8. | Datenverarbeitung..... | 39 |
| III | Ergebnisse | 40 |
| 1. | Identifizierung der kleinsten Region des Fibronektin-Bindungsproteins SfbI von <i>S. pyogenes</i> , welche eine schützende Immunantwort stimuliert..... | 40 |
| 1.1 | Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine..... | 40 |
| 1.2 | Charakterisierung der durch verschiedene Regionen des SfbI hervorgerufenen Immunantworten | 41 |
| 1.2.1 | Antigenspezifische, humorale Immunantwort | 41 |
| 1.2.2 | Antigenspezifische, mukosale Antikörperantwort | 43 |
| 1.2.3 | Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit SfbI-Derivaten | 44 |
| 1.2.4 | Analyse des durch verschiedene SfbI-Derivate nach intranasaler Immunisierung hervorgerufenen Impfschutzes | 45 |
| 1.3 | Ausbildung eines schützenden immunologischen Gedächtnisses nach intranasaler Immunisierung mit dem SfbI-Derivat H12 | 46 |
| 1.3.1 | Antigenspezifischer Antikörpertiter im Serum drei Monate nach intranasaler Immunisierung | 46 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 1.3.2 | Antigenspezifischer, mukosaler IgA-Titer drei Monate nach intranasaler Immunisierung | 47 |
| 1.3.3 | Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort drei Monate nach intranasaler Immunisierung mit dem SfbI-Derivat H12 | 48 |
| 1.3.4 | Analyse der Effizienz des immunologischen Gedächtnisses nach intranasaler Immunisierung mit der Fibronectin-Bindungsdomäne | 49 |
| 1.4 | Antigenspezifische Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit dem SfbI-Derivat H12 ohne Koadministration des mukosalen Adjuvans | 50 |
| 1.4.1 | Antigenspezifische, humorale Immunantwort | 50 |
| 1.4.2 | Antigenspezifische, mukosale Antikörperantwort | 51 |
| 1.4.3 | Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort | 52 |
| 1.4.4 | Analyse des durch das SfbI-Derivat H12 hervorgerufenen Impfschutzes ohne Koadministration des Adjuvans CTB | 52 |
| 2. | Epitop-Mapping innerhalb der Fibronectin-Bindungsdomäne | 53 |
| 2.1 | Charakterisierung linearer B-Zell-Epitope | 55 |
| 2.2 | Charakterisierung von T-Zell-Epitopen | 61 |
| 3. | Fibronectin bindendes Protein SfbI von <i>Streptococcus pyogenes</i> als Adjuvans | 63 |
| 3.1 | Klonierung des Ovalbumin aus dem Huhn in den prokaryontischen Expressionsvektor pQE30 | 64 |
| 3.2 | Charakterisierung der für die Adjuvanseigenschaft verantwortlichen Domäne | 67 |
| 3.2.1 | Antigenspezifische, humorale Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit β -Galaktosidase koadministriert mit SfbI-Derivaten | 68 |
| 3.2.2 | Antigenspezifische, mukosale Antikörperantwort | 70 |
| 3.2.3 | Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit β -Galaktosidase koadministriert mit SfbI-Derivate | 71 |
| 4. | <i>Salmonella</i> spp. als Lebendimpfstoff gegen <i>S. pyogenes</i> | 72 |
| 4.1 | Generierung eines Expressionsvektors zur Sekretion der Fibronectin-Bindungsdomäne von SfbI durch <i>Salmonella</i> spp. | 72 |
| 4.2 | Modulation der Immunantwort durch Koexpression von Cytokinen | 74 |
| IV | Diskussion | 78 |
| 1. | Impfschutz vor <i>Streptococcus pyogenes</i> | 78 |
| 1.1 | Identifizierung und Charakterisierung des kleinsten, einen Impfschutz hervorrufenden Bereichs des Proteins SfbI | 79 |
| 1.2 | Stimulation eines immunologischen Gedächtnisses durch die Fibronectin-Bindungsdomäne | 80 |
| 1.3 | Durch die Fibronectin-Bindungsdomäne induzierter Impfschutz vor <i>S. pyogenes</i> ohne Koadministration eines mukosalen Adjuvans | 82 |
| 2. | Identifizierung von B- und T-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsdomäne des Proteins SfbI | 83 |
| 3. | Fibronectin-Bindungsdomäne des Proteins SfbI als mukosales Adjuvans | 85 |
| 4. | Entwicklung eines auf Salmonellen basierenden Impfstoffkandidaten gegen <i>S. pyogenes</i> | 87 |
| 5. | Koexpression von Cytokinen bei der Immunisierung zur Modulation der Immunantwort | 88 |
| | Referenzen | 90 |
| | Anhang | 101 |
| | Abbildungsverzeichnis | 103 |
| | Tabellenverzeichnis | 106 |

Zusammenfassung

Infektionskrankheiten stellen etwa ein Drittel aller Todesursachen weltweit dar und die Tendenz ist steigend. So treten nicht nur neue Krankheitserreger auf, sondern auch bereits kontrollierbar geglaubte Krankheiten sind wieder auf dem Vormarsch. Ein Humanpathogen ist *Streptococcus pyogenes*, ein gram-positives, β -hämolytisches Bakterium, welches über eine Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren verfügt. *S. pyogenes* gehört zu den Streptokokken der Gruppe A und verursacht sowohl lokale, nicht-invasive Krankheiten wie Pharyngitis, Tonsillitis, Impetigo, Erysipel oder Scharlach, als auch invasive Krankheiten wie nekrotisierende Fasciitis oder das Toxischer-Schock-Syndrom. Die invasiven Erkrankungen sind sehr schwerwiegend, da sich die Infektion trotz früher, intensiver Behandlung mit Antibiotika schnell entwickeln kann und entweder zum Absterben von Gewebe führt oder ein multiples Organversagen, Schock und schließlich den Tod nach sich zieht. Doch auch die vermeintlich harmloseren, lokalen Infektionen bergen Gefahren. Nicht selten entwickeln sich aus Mandelentzündung und Scharlach Folgeerkrankungen wie das rheumatische Fieber, in dessen Verlauf es zur Zerstörung der Herzklappen kommen kann oder die Glomerulonephritis, bei der es aufgrund von Autoimmunreaktionen zur Schädigung der Nieren und schließlich zur Niereninsuffizienz kommt. Das immer häufigere Auftreten von resistenten Stämmen und die Fähigkeit der Streptokokken, der Antibiotikabehandlung durch Invasion der Wirtszellen zu entgehen, machen die Notwendigkeit der Entwicklung eines Impfstoffes deutlich.

Das Fibronektin Bindungsprotein I (SfBI), ein oberflächengebundenes Protein, welches einerseits die Adhäsion der Bakterien über Fibronektin an den Epithelzellen ermöglicht und andererseits die Invasion in diese Zellen vermittelt, hat sich als potentieller Impfstoffkandidat erwiesen und besitzt bisherigen Studien zufolge darüber hinaus Eigenschaften eines mukosalen Adjuvans. Um das Potential von SfBI als Impfstoffkandidat und mukosalem Adjuvans vollständig nutzen zu können, ist eine genauere Charakterisierung der für die verschiedenen biologischen Eigenschaften als Adhäsion, Invasin und immunglobulinbindendes Protein benötigten Proteindomänen notwendig.

In dieser Arbeit konnte anhand von Immunisierungsstudien gezeigt werden, dass zur Stimulation einer schützenden Immunantwort gegen *S. pyogenes* lediglich die Fibronektin-Bindungsdomäne notwendig ist. Die Immunisierung der Mäuse mit diesem Bereich des Proteins SfBI führte ebenso wie die Immunisierung mit SfBI selbst zur Ausbildung einer starken, humoralen und vor allem mukosalen Immunantwort und bot einen Impfschutz von 80%. Die Immunisierung mit einem Fragment bestehend aus der aromatischen Domäne und den prolinreichen *Repeats* stimulierte zwar ebenso eine starke, humorale Immunantwort, besaß jedoch nicht das Potential die Mäuse vor einer Infektion zu schützen, da eine mukosale Immunantwort ausblieb. Des weiteren konnte in Infektionsversuchen die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses beobachtet werden, wonach 80% der geimpften Mäuse auch drei Monate nach der Vakzinierung mit der Fibronektin-Bindungsdomäne vor einer Infektion mit *S. pyogenes* geschützt waren.

Dieser Impfschutz ließ sich auch dann noch erzielen, wenn die Immunisierung der Tiere ausschließlich mit dem Antigen, d.h. ohne Koadministration der B-Untereinheit des Cholera-Toxins (CTB) als mukosales Adjuvans erfolgte. Die Charakterisierung der Immunantworten hat ergeben, dass SfBI bzw. die Fibronektin-Bindungsdomäne in der Lage ist, unabhängig von CTB die Produktion SfBI-spezifischer IgA in der Mukosa zu stimulieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Verabreichung von CTB für die Induktion der Th2-Antwort nicht ausschlaggebend war. Die Möglichkeit eine erfolgreiche Impfung gegen *S. pyogenes* durchführen zu können ohne ein mukosales Adjuvans zu benötigen, stellt einen weiteren, großen Vorteil von SfBI als Impfstoffkandidaten dar.

Durch Epitop-Mapping konnten in der Fibronektin-Bindungsdomäne lineare B-Zellepitope und ein T-Zellepitop identifiziert werden. So hat sich gezeigt, dass in BALB/c-Mäusen ein Epitop etwa in der Mitte jedes *Repeats* lokalisiert ist und sich eines im Übergang von *Repeat* zu *Repeat* befindet. Versuche mit Serien immunisierter, congener Mäuse führten bei den Stämmen BALB/b und BALB/k jedoch zur Identifizierung einer anderen linearen Antigen determinante. Diese beiden Stämme erkennen ein Epitop, welches in den *Repeats* jeweils N-terminal lokalisiert ist. Die Bindung der Fibronektin-Bindungsdomäne durch Antikörper erfolgt demnach an unterschiedlichen Bereichen, so dass für einen auf Peptiden basierenden Impfstoff die Identifizierung der linearen B-Zellepitope weiterer Haplotypen notwendig erscheint, um eine effiziente Antikörperantwort in möglichst vielen Individuen hervorrufen zu können. Die identifizierte Region mit dem T-Zellepitop der BALB/c-Mäuse befindet sich ebenfalls im Übergang von einem *Repeat* zum nächsten. Sie enthält sowohl ein B-Zellepitop der BALB/c-Mäuse als auch den Großteil des B-Zellepitops der congenen Stämme BALB/b und BALB/k. Die Verwendung des entsprechenden Peptids in einen Impfstoff hätte den Vorteil, alle nötigen Epitope bereits in sich zu vereinen.

Weiterhin ließ sich im Rahmen dieser Arbeit die Adjuvanseigenschaft von SfbI bestätigen. Es zeigte sich, dass sowohl die Fibronektin-Bindungsdomäne als auch das Fragment mit der aromatischen Domäne und den prolinreichen *Repeats* die Fähigkeit besitzen, die humorale und entscheidender, die mukosale Immunantwort gegen ein koadministriertes Antigen zu verstärken. Nicht nur die Menge der produzierten Antikörper wurde gesteigert, sondern auch die Kinetik der Produktion. Darüber hinaus wurde durch SfbI die Stimulation der Th2-Zellen verstärkt, was aus einer wesentlich ausgeprägteren IgG1-Antwort hervorging. Der zugrunde liegende Mechanismus der Adjuvanseigenschaft beruht wahrscheinlich hauptsächlich auf einer unspezifischen Aktivierung der antigenspezifischen B-Zellen, da eine Verstärkung der T-Zellantwort nicht beobachtet werden konnte.

Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob eine Impfung gegen *S. pyogenes* auch mit Hilfe attenuierter Bakterien als Antigenträger möglich ist. Dazu würden Mäuse mit Salmonellen infiziert, welche den während dieser Arbeit generierten Expressions- und Sekretionsvektor mit dem Gen für die Fibronektin-Bindungsdomäne transportieren. Dieses Gen ist mit dem Hämolysin-Transportersystem von *Escherichia coli* fusioniert, wodurch nach erfolgter Expression und Sekretion das Antigen eine optimale Immunantwort auslösen sollte. Durch den Einsatz von SfbI könnte darüber hinaus die Effizienz der Salmonellen als Träger weiterer heterogener Antigene gesteigert werden.

Die Modulation von Immunantworten kann mit Hilfe von Cytokinen auch auf Ebene der DNA-Vakzinierung erfolgen. Dazu wurden während dieser Arbeit eukaryontische Expressionsvektoren für verschiedene Cytokine generiert. Die Immunisierung mit Salmonellen, welche diese Plasmide enthalten sollte zur Expression der entsprechenden Cytokine *in vivo* führen. Durch den gezielten Einsatz von Cytokinen wäre einerseits eine Verstärkung der Immunantwort möglich, andererseits ließe sich auch die Richtung der Immunantwort verändern.

Dass auf diesem Wege eine effiziente Expression durch eukaryontische Zellen stattfindet konnte während dieser Arbeit anhand von INF- γ gezeigt werden. Hier führte die Immunisierung von INF- γ -defizienten Mäusen mit Salmonellen, die einen für INF- γ kodierenden, eukaryontischen Expressionsvektor trugen zur Korrektur des Gendefekts.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fibronektin-Bindungsdomäne einen attraktiven Impfstoffkandidaten darstellt. Immunisierungen führen zu einem lang anhaltendem Schutz vor Streptokokkeninfektionen. Es bedarf keines mukosalen Adjuvans für die Stimulation des Impfschutzes, und Immunantworten gegen gleichzeitig verabreichte Antigene werden deutlich verstärkt. Die gewonnenen Erkenntnisse erleichtern nicht nur die Entwicklung neuer, auf SfbI beruhender Impfstoffe gegen *S. pyogenes*, sondern erlauben auch die mögliche Generierung von Impfstoffen mit SfbI als mukosales Adjuvans.

I. Einleitung

1. Infektionskrankheiten

Immer noch stellen Infektionskrankheiten weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar. So ist dem Weltgesundheitsbericht der WHO von 1998 zu entnehmen, dass 1997 etwa 33% der über 52 Millionen Todesfälle auf Infektionskrankheiten zurückzuführen waren (Abb.1A). Doch nur etwa sechs Krankheiten sind hauptsächlich für die Mortalitätsrate verantwortlich (Abb.1B).

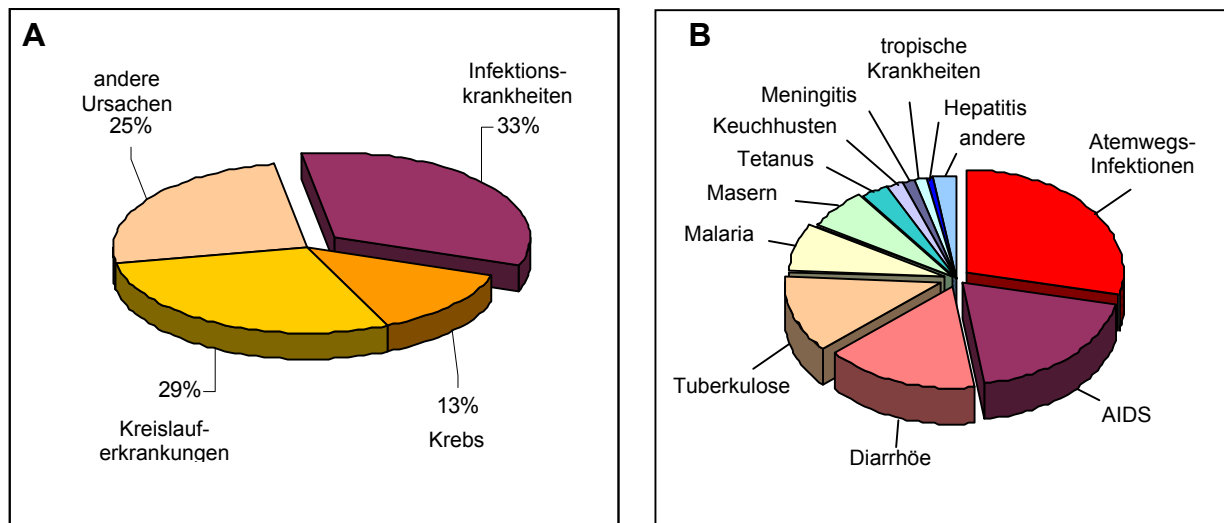


Abb.1: A) Darstellung der weltweit häufigsten Todesursachen in dem Jahr 1997 (modifiziert nach World Health Report 1998; WHO/OMS). B) Darstellung der häufigsten, zum Tode führenden Infektionskrankheiten (Daten des World Health Reports 2000; WHO/OMS).

Die Bedrohung durch Krankheitserreger besteht aber nicht nur für Entwicklungsländer, sondern auch in den Industrieländern kommt es trotz deutlich besserer, hygienischer Bedingungen immer wieder zu Epidemien und Todesfällen. Es treten plötzlich neue Pathogene, wie mutierte Influenzaviren oder *Legionella pneumophila* in Erscheinung und es kommt zu einem Wiederaufleben bereits kontrollierbar geglaubter Krankheitserreger, einhergehend mit neuerlichen Epidemien von enterohämorrhagischen *Escherichia coli*, Pest, Cholera und Tuberkulose (Murphy, 1994). Ferner hat sich herausgestellt, dass Krankheiten wie z.B. chronische Erkrankungen des Kreislauf- oder Nervensystems oder Krebs ebenfalls durch Infektionen hervorgerufen werden können. So kann Gebärmutterkrebs durch Papillomaviren, Leberkrebs durch chronische Hepatitis B und C und Blasenkrebs durch eine chronische Schistosomiasis hervorgerufen werden (WHO/CDS/99.1).

Schließlich wird auch die Bekämpfung von Infektionen erschwert, denn immer mehr Krankheitserreger zeichnen sich durch Multiresistenzen gegenüber verschiedenster Medikamente aus. So ist z.B. in einigen Ländern Osteuropas bereits einer von fünf an Tuberkulose Erkrankten mit einem multiresistenten *Mycobacterium tuberculosis*-Stamm

infiziert, Chloroquine, einstmals erfolgreiches Medikament bei einer Malaria-Erkrankung, sind heute in mehr als 80 von den 92 Ländern, in denen Malaria das Hauptproblem darstellt, nicht mehr effektiv wirksam, und schließlich stellen multiresistente Staphylokokken in Krankenhäusern heutzutage eines der größten Gesundheitsrisiken dar (WHO/CDS/99.1).

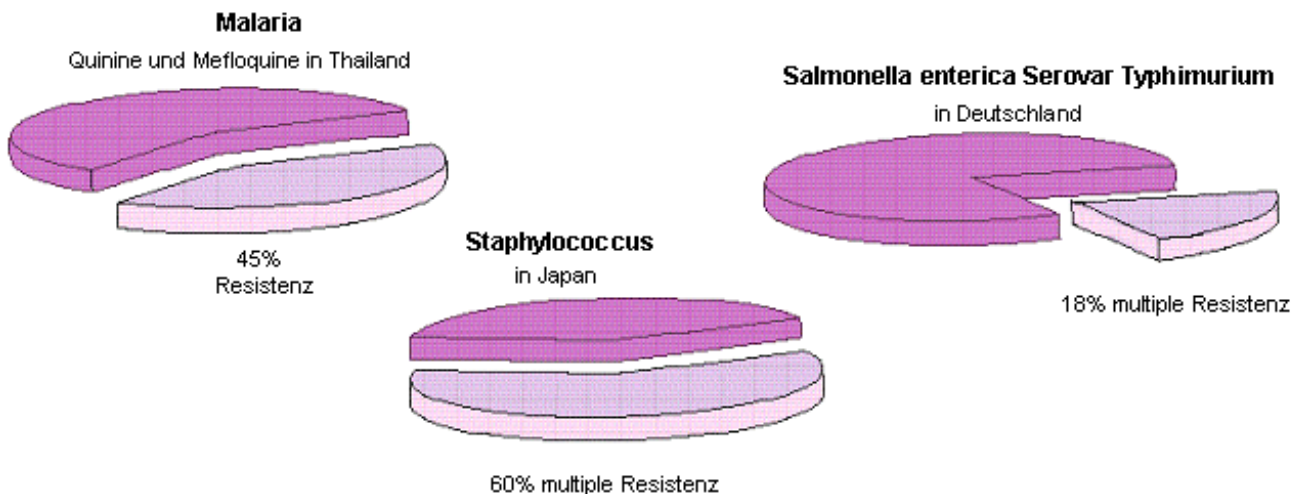


Abb.2: Darstellung antibakterieller Resistenzen anhand dreier Beispiele (modifiziert nach WHO Report on Infectious Diseases 1999 und 2000; WHO/CDS/99.1, WHO/CDS/2000.2).

Die Ursachen für das Auftreten solcher multiresistenten Bakterien liegen wahrscheinlich in dem Missbrauch von Antibiotika begründet. Oft werden unnötig oder falsche Antibiotika verschrieben oder die Einnahme der Medikamente erfolgt nicht ausreichend lang. Darüber hinaus werden antimikrobielle Mittel in der Massentierhaltung eingesetzt, wodurch der Selektionsdruck künstlich gesteigert wird (WHO/CDS/99.1).

Der Einsatz antibakterieller Medikamente der zweiten und dritten Stufe ist teuer und zudem häufig mit schwereren Nebenwirkungen für den Patienten verbunden. Länger anhaltende Krankheit, stationäre Behandlung in einem Krankenhaus und der damit verbundene Verlust der Arbeitskraft eines mit einem resistenten Pathogen infizierten Patienten lassen die Kosten abermals ansteigen (WHO Report on Infectious Diseases 2000; WHO/CDS/2000.2). Impfstoffe hingegen können diese anfallenden Kosten deutlich verringern, wenn nicht sogar verhindern, indem sie nicht nur der Entwicklung einer Krankheit vorbeugen, sondern auch die Ausbildung von Resistenzen verhindern. Die Kontrolle von Infektionskrankheiten ist, wenn überhaupt, auf lange Sicht und im Hinblick auf die schnelle Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen nur durch weltweit durchgeführte Impfprogramme möglich.

2. *Streptococcus pyogenes*

Eine neue Bedrohung stellen aufgrund auftretender Resistenzen (Cornaglia, 1996; Johnson *et al.*, 1992; Neu, 1992; Stevens, 1995,) und fehlender Impfstoffe auch Infektionen mit Streptokokken der Gruppe A (GAS) dar. Streptokokken sind gram-positive, unbewegliche, fakultativ anaerobe Kokken, die sich paarweise oder in Ketten anordnen. Die Einteilung erfolgt zum einen nach ihrem Hämolysevermögen (alpha-, beta-, gamma-Hämolyse) und zum

anderen anhand ihrer unterschiedlichen Antigenität aufgrund ihres Lancefield-Antigens (Gruppe A-V), einem in der Zellwand vorkommenden Kohlehydrat.

S. pyogenes gehören den GAS an und sind β -hämolytisch, d.h. sie sind in der Lage, Erythrozyten vollständig zu lysieren. Verantwortlich für die Lyse sind die extrazellulären Enzyme Streptolysin O und S, welche die Membran der Erythrozyten zerstören. Weitere von GAS gebildete Enzyme sind die Streptokinase, welche Fibrin löst und dadurch die Ausbreitung der Streptokokken im Gewebe fördert, die Hyaluronidase, mit deren Hilfe es zur Auflösung des Gewebes kommt und verschiedene DNAsen.

Neben den Enzymen werden von GAS außerdem pyrogene (= fiebererzeugende) Toxine produziert. Diese Toxine (A, B, C) zeichnen sich verantwortlich für Fieber, Scharlach-Exanthem und –Enanthem und dem Toxischer-Schock-Syndrom.

S. pyogenes dringen über Traumen der Haut oder der Schleimhäute in den Wirt ein und verursachen lokale, nicht-invasive Infekte (z.B. Pharyngitis, Tonsillitis, Impetigo oder Erysipel = Wundrose, u.a. einhergehend mit hohem Fieber, Schüttelfrost, schmerzhaften Rötungen, teils mit Blasen, Einblutungen oder Nekrosen). Darüber hinaus kann es zu einer massiven Ausbreitung im Gewebe mit darauffolgender nekrotisierender Fasciitis, Sepsis oder zum septischen Schock, der schwersten Komplikation, kommen. Schließlich können sich im Anschluss an die nicht-invasiven Infektionen noch schwere Folgeerkrankungen wie Glomerulonephritis (Oligurie mit Protein- u. Hämaturie, Hypertonie, Ödeme) oder das akute, rheumatische Fieber (Endokarditis, Polyarthrit) entwickeln (Abb.3).

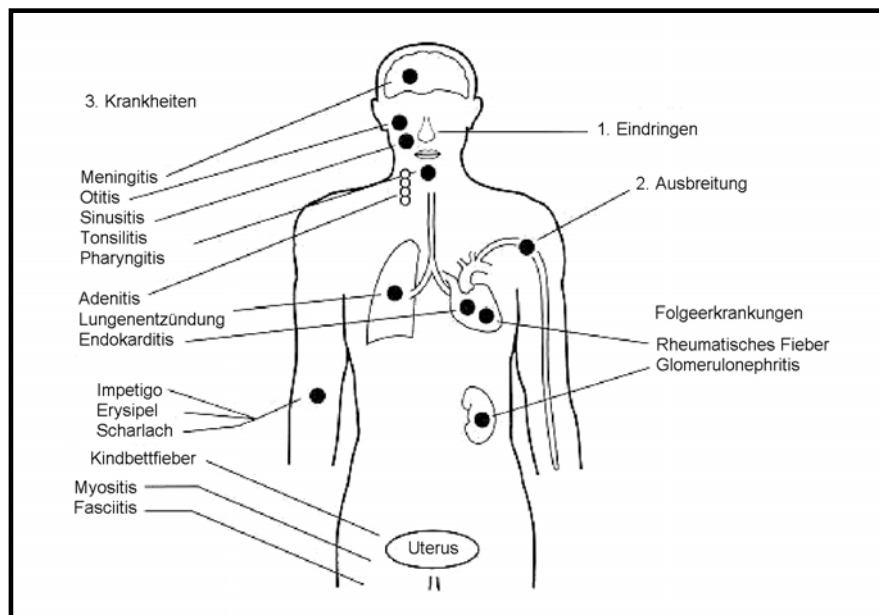


Abb.3: Pathogenese von Infektionen mit *S. pyogenes* (modifiziert nach M.J. Patterson, Graduate School of Biomedical Sciences at UTMB)

Bis vor etwa 20 Jahren wurde GAS-Infektionen keine besondere Beachtung geschenkt. Dann aber nahmen weltweit die Krankheitsfälle in allen Bevölkerungsschichten zu und vor allem die schweren Folgeerkrankungen wie das rheumatische Fieber traten immer häufiger in Erscheinung (Bisno, 1991; Johnson, *et al.*, 1992; Kaplan, 1991; Stevens, 1995). So wird geschätzt, dass jährlich etwa 10-20 Millionen neue Fälle rheumatischen Fiebers auftreten (Gibofsky and Zabriskie, 1995) und das etwa 400000 Patienten, vor allem Kinder und junge Menschen, daran sterben (Press Release WHO/73, 1999). Ebenso wird davon ausgegangen, dass etwa 10%-13% der an invasiven Infektionen erkrankten Menschen sterben, 45% der an dem streptokokkalen Toxischer-Schock-Syndrom leidenden und 25% der an nekrotisierender Fasciitis erkrankten Patienten (Centers for Disease Control and Prevention).

Neben der zunehmenden Resistenz gegenüber Antibiotika gelingt es den GAS möglicherweise auch, sich durch invadieren in die Epithelzellen der oberen Atemwege der Behandlung mit Antibiotika zu entziehen (LaPenta *et al.*, 1994; Molinari *et al.* 1997), und darüber hinaus scheint es, als hätten sie die Fähigkeit rheumatisches Fieber hervorzurufen, durch horizontalen Gentransfer auf Streptokokken der Gruppen C und G übertragen (Haidan *et al.* 2000). Das Therapieren von GAS-Infektionen ist demnach nur wenig effektiv und es macht deutlich, wie wichtig die Prävention mit Hilfe von Impfstoffen ist.

3. Impfung

Seitdem Edward Jenner vor etwa 200 Jahren die erste erfolgreiche Schutzimpfung gegen Pocken durchgeführt hat wurden zahlreiche Impfstoffe und weltweite Programme zur Kontrolle von Infektionskrankheiten entwickelt (Tab.1).

Tab.1: Humanpathogene, gegen die Impfstoffe entwickelt wurden (Daten der WHO entnommen).

| Pathogen | Krankheit |
|--|------------------------------|
| Hepatitis A und B Viren | Leberzirrhose |
| Influenza A, B und C | Grippe |
| Masernvirus | Masern |
| Mumps | Mumps, Mumpsmeningitis |
| Poliovirus | Kinderlähmung |
| Rabiesvirus | Tollwut |
| Rubellavirus | Röteln |
| | |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | Lyme-Borreliose |
| <i>Bordetella pertussis</i> | Keuchhusten |
| <i>Clostridium tetani</i> | Wundstarrkrampf |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Diphtherie |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Meningitis, Lungenentzündung |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | TBC |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Meningitis, Sepsis |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhi | Typhöse Salmonellose |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Lungenentzündung, Meningitis |
| <i>Vibrio cholerae</i> | Cholera* |

* Impfungen wurden wieder eingestellt, da lediglich ein Schutz von 50% erzielt wurde und dieser nur 3-6 Monate anhielt.

Nach den Entdeckungen von Louis Pasteur (1881), dass die Verabreichung abgeschwächter Bazillen (*Bacillus anthracis*) sowohl Tiere als auch den Menschen vor Milzbrand schützen kann und von Salmon und Smith (1886), dass auch abgetötete Krankheitserreger als wirksamer Impfstoff eingesetzt werden können, trug die Entschlüsselung der einzelnen Komponenten des menschlichen Immunsystems in den darauffolgenden Jahrzehnten entscheidend zum heutigen Entwicklungsstand von Impfstoffen bei (Ada and Ramsay, 1996). So entdeckten Von Behring und Kitasato die Antikörper und deren Funktion zur Abwehr von Pathogenen und Metchnikoff beschrieb zur gleichen Zeit zum ersten Mal Phagocyten. Es folgten die Entdeckung der Lymphocyten, die Beschreibung der Cytokine und die Einteilung in humorale und zellvermittelte Immunität.

Doch obwohl durch weltweite Impfprogramme Krankheiten wie Pocken (1980 von der WHO für ausgerottet erklärt), Polio (1994 in Amerika für ausgerottet erklärt; De Quadras, 1994), Keuchhusten (Begg und Cutts, 1994) oder durch *Haemophilus influenzae* verursachte Meningitis effektiv bekämpft und eingedämmt werden konnten (Adams *et al.*, 1993), ist die Zahl der Infektionskrankheiten, für die es keine (z.B. HIV) oder nur unzureichend wirksame Impfstoffe (z.B. Tuberkulose und Cholera), gibt, weiterhin groß.

Man unterscheidet bei der Impfung zwischen passiver und aktiver Immunisierung. Während dem Patienten bei der passiven Immunisierung Antikörper von z.B. Rekonvaleszenten oder bereits geimpften Personen übertragen werden, wird bei der aktiven Immunisierung das Immunsystem des Patienten durch den Impfstoff zur Ausbildung einer spezifischen Immunität angeregt. Dies führt meistens zu einem deutlich längeren Impfschutz gegenüber der passiven Immunisierung. Die Zusammensetzung gebräuchlicher Impfstoffe beruht entweder auf lebenden, aber in ihrer Virulenz abgeschwächten Erregern (z.B. Masern, Mumps, Windpocken und Kinderlähmung), auf abgetöteten Erregern (z.B. Frühsommer-Meningoenzephalitis und Kinderlähmung) oder auf entgifteten, bakteriellen Toxinen (z.B. Diphtherie, Tetanus und Keuchhusten). Neben den Toxinen können darüber hinaus weitere bakterielle Moleküle wie z.B. chemisch gereinigte Kapselpolysaccharide (z.B. Pneumokokken, Meningokokken und *Haemophilus influenzae* Serotyp b) oder rekombinante Oberflächenproteine (z.B. Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Keuchhusten) zum Einsatz kommen. Neuere Ansätze der Impfstoffforschung umfassen den Einsatz synthetischer Polypeptide, anti-idiotypischer Antikörper und die DNA-Vakzinierung.

Bei der Entwicklung eines Impfstoffes steht an erster Stelle die Entscheidung, welches Antigen den gewünschten Impfschutz liefert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Weg, über den der Impfstoff verabreicht wird, die Wirkung entscheidend beeinflusst (Lanzavecchia, 1993). So kann bei falscher Verabreichung das richtige Antigen dennoch nicht in der Lage sein, eine schützende Immunantwort zu induzieren. Weiterhin ist für den Impfstoff wichtig, dass in jedem Individuum ein Impfschutz erzielt werden kann und dass dieser dann gegen möglichst viele Serotypen eines Pathogens gleichzeitig wirkt.

Eine Impfung gegen Pathogene wie *S. pyogenes*, die über die Schleimhäute den Wirt besiedeln sollte daher mukosal durchgeführt werden, so dass bereits am Ort des ersten Kontakts eine schützende Immunantwort stimuliert wird. Das in den Schleimhäuten am stärksten vertretene Immunglobulin (Ig) ist sekretorisches IgA (sIgA). sIgA spielt eine wesentliche Rolle bei der Neutralisierung von Pathogenen, da es die bakteriellen Adhäsine

blockieren und somit eine Kolonisierung verhindern kann (Corthésy and Spertini, 1999; Lamm, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

4. Virulenzfaktoren als Impfstoff

Adhäsine stellen einen wesentlichen Virulenzfaktor mukosaassoziiierter Pathogene dar. Es verwundert daher nicht, dass GAS nicht nur über ein, sondern über eine Vielzahl solcher Oberflächenproteine verfügen, die es ihnen ermöglichen, an der Zielzelle zu adhären, zu kolonisieren und sich schließlich im Wirtsorganismus auszubreiten. Einer der wichtigsten Vertreter dieser Virulenzfaktoren ist das M Protein. Dieses Protein besitzt die Eigenschaft, Wirtsproteine wie Fibrinogen oder den Komplementfaktor H zu binden und dadurch der Wirtsabwehr zu entgehen. Durch Bindung des Faktors wird z.B. die Aktivierung des alternativen Komplementsystemweges gestört, wodurch die Phagocytose der Kokken durch Makrophagen stark eingeschränkt wird und es dem Krankheitserreger letztlich möglich ist, sich zu etablieren.

Anhand der verschiedenen M Proteine lassen sich mehr als 100 unterschiedliche Serotypen von GAS ausmachen (Brandt, *et al.* 2000). M Proteine stimulieren im Wirt zwar eine schützende, humorale Immunantwort, jedoch ist diese serotypspezifisch, so dass für einen potentiellen Impfstoff eine Kombination aus vielen M Proteinen notwendig wäre, um tatsächlich einen Schutz vor einer Streptokokkeninfektion gewährleisten zu können. Gegen die Nutzung von M Proteinen als Impfstoff spricht außerdem, dass es zu Kreuzreaktionen der M Protein-spezifischen Antikörper mit dem wirtseigenem Herzmyosin kommt, welche letztlich wenigstens zum Teil für die beschriebenen Folgeerkrankungen verantwortlich sind (Cunningham *et al.*, 1993 und 1997; Dale *et al.*, 1985; Guilherme *et al.*, 1995; Manjula *et al.*, 1985; Pruksakorn *et al.*, 1994). Und auch wenn in neuerer Zeit das Potential konservierter Bereiche des M Proteins als möglicher Impfstoff untersucht wird (Dale, 1998), ist doch das Interesse an anderen Antigenen für die Konstruktion eines Vakzins gewachsen. So konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Cysteinprotease und die oberflächengebundene C5a-Peptidase potentielle Impfstoffkandidaten darstellen (Ji *et al.* 1997; Kapur *et al.* 1994).

1991 wurde von Talay *et al.* außerdem ein weiteres und wie sich später zeigte sehr wichtiges Streptokokken-Adhäsin identifiziert, das Fibronectin-Bindungsprotein I (SfbI) von *S. pyogenes*. Mit Hilfe dieses Oberflächenproteins binden die Bakterien nicht direkt an ein Rezeptormolekül der Wirtszelle, sondern die Anheftung wird durch das Wirtsprotein Fibronectin vermittelt (Talay *et al.*, 2000). Fibronectin ist ein großes, multifunktionales Glykoprotein, welches zum einen in löslicher Form im Plasma und zum anderen in unlöslicher Form in der extrazellulären Matrix zu finden ist. Die Bindung des Fibronectin an die Wirtszelle erfolgt an dem Zelloberflächenrezeptor $\alpha 5\beta 1$ -Integrin. Fibronectin beeinflusst die Zellgestalt und die Anordnung des Cytoskeletts. Ferner fördert Fibronectin die Wundheilung durch Fibrin-Bindung und ist an der Wanderung von Zellen wie den Fibroblasten beteiligt.

5. SfbI

S. pyogenes nutzt das Fibronectin als Brücke zur Wirtszelle, durch Anheftung mittels SfbI (Talay *et al.*, 1992 und 2000). SfbI umfasst 638 Aminosäuren und besteht aus fünf distinkten Domänen. Das Protein besitzt ein Signalpeptid gefolgt von einer aromatischen Domäne. Der

zentrale Bereich enthält vier prolinreiche Sequenzwiederholungen, die von nicht-repetitiven Sequenzen flankiert werden. Schließlich folgt ein weiterer Bereich mit vier Sequenzwiederholungen, die zusammen mit dem davor gelagerten *Spacer* die Fibronektin-Bindungsdomäne bilden. Am C-terminalen Ende des SfbI befindet sich ein typischer Zellwand- und Membrananker (Talay *et al.*, 1994, Abb.4).



Abb.4: Schematische Darstellung des Fibronektin-Bindungs-Proteins SfbI von *S. pyogenes*.

Neben der Anheftung an die Epithelzellen vermittelt SfbI außerdem die Invasion in die Wirtszelle und ist in der Lage, an das Fc-Fragment menschlicher und an das F(ab')₂-Fragment muriner Ig unspezifisch zu binden (Molinari *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1999 und 2000). Dabei stellt die Bindung an die Ig wahrscheinlich einen Mechanismus zur Umgehung der Immunabwehr des Bakteriums dar. Sowohl die Phagozytose durch Makrophagen als auch die antikörperabhängige, zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) sind Fc-Rezeptoren-vermittelt. SfbI konnte in einer Vielzahl klinischer Isolate verschiedener Serotypen (73%) detektiert werden und es hat sich gezeigt, dass die Fibronektin-Bindungs-Domäne des Proteins hoch konserviert ist (Talay *et al.*, 1994; Valentin-Weigand *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnten keine Kreuzreaktionen der gegen SfbI gebildeten Antikörper mit wirtseigenen Proteinen beobachtet werden (Valentin-Weigand *et al.*, 1994).

Weiterhin wurde gezeigt, dass SfbI das Potential besitzt, als Adjuvans zu wirken. So führte die intranasale Gabe eines kovalent an SfbI gekoppelten Antigens im Vergleich zur Immunisierung ohne SfbI zu einer deutlich gesteigerten Immunantwort gegen das Antigen (Medina *et al.*, 1998). Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Adjuvanseigenschaft beruht wahrscheinlich auf der Quervernetzung membrangebundener Ig, wodurch es zu einer unspezifischen B-Zellaktivierung und der vermehrten Produktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse 2 durch antigenpräsentierende Zellen (APC) kommt (Medina *et al.*, 1998, 1999 und 2000).

Schließlich konnte durch Infektionsstudien am Mausmodell bereits gezeigt werden, dass eine Impfung der Tiere mit SfbI einen Schutz vor Streptokokkeninfektionen von 80% bietet und dass dieser Impfschutz sowohl gegen einen homologen als auch einen heterologen Streptokokkenstamm besteht (Guzmán *et al.*, 1999).

Für die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes basierend auf SfbI, sei es zum Schutz vor GAS-Infektionen oder als mukosales Adjuvans, ist eine genauere Charakterisierung der für die verschiedenen, biologischen Funktionen des Proteins (Adhäsion, Invasion, Immunglobulinbindendes Protein) benötigten Proteindomänen notwendig.

6. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welcher Teil des Proteins SfbI von *S. pyogenes* den kleinsten für die Stimulation einer protektiven Immunantwort benötigten Bereich darstellt. Es hatte sich gezeigt, dass das Holoprotein sowohl bei der Aufreinigung als auch bei der Lagerung sehr instabil ist, während verkürzte Fragmente deutlich weniger einer Degradation unterlagen. Es sollten daher verschiedene distinkte Bereiche kloniert, überexprimiert und nach Aufreinigung in Immunisierungsstudien eingesetzt werden.

Mittels Immunisierungsstudien sollte außerdem untersucht werden, ob durch SfbI bzw. einer distinkten Region des Proteins ein immunologisches Gedächtnis induziert werden kann, so dass ein Impfschutz über längere Zeit besteht.

Darüber hinaus sollte die Möglichkeit geprüft werden, SfbI ohne dem mukosalen Adjuvans Cholera-Toxin B-Untereinheit (CTB) als Impfstoff einzusetzen. Zur Klärung wurden wiederum Immunisierungsstudien durchgeführt.

Innerhalb der für den Impfschutz verantwortlichen Region sollten schließlich T-Zell- und lineare B-Zellepitope identifiziert und charakterisiert werden. Dazu sollten sich überlappende Peptide, die die entsprechende Proteinsequenz umfassen, synthetisiert und in immunologischen Studien eingesetzt werden.

Ferner sollte der Bereich des SfbI näher identifiziert und charakterisiert werden, der für die Adjuvanseigenschaft des Proteins verantwortlich ist. Hierzu sollten Fusionsproteine bestehend aus den Modellantigenen Ovalbumin oder β -Galaktosidase und SfbI bzw. einem verkürzten Derivat kloniert, überexprimiert und nach Aufreinigung in Immunisierungsstudien eingesetzt werden.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme, eukaryontische Zelllinien, Tiere und Plasmide

1.1 Bakterienstämme

Tab. 2: Verwendete Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Genotyp/Serotyp | Herkunft/Referenz |
|----------------------------|--|---------------------------|
| <i>E. coli</i> M15[pREP4] | Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ | Qiagen |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 thi</i> ⁻ <i>gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>pro AB lacI</i> ^q ZΔ <i>M15 Tn10 Tet r</i>] | Stratagene |
| <i>S. pyogenes</i> (NS192) | Vir type 3.2 | Oxoid, Basingstoke, UK |

1.2 Eukaryontische Zellen

Tab. 3: Verwendete eukaryontische Zelllinien

| Zelllinie | Ursprung | Herkunft/Referenz |
|-----------|--------------------------|-------------------|
| EL4 | Lymphoma aus der Maus | ATCC TIB 39 |
| P815 | Mastocytoma aus der Maus | ATCC TIB 64 |

1.3 Tiere

Die verwendeten Mäuse waren immer weiblich und zwischen 4-8 Wochen alt.

Tab. 4: Verwendete Tiere

| Maus | Genotyp/Serotyp | Herkunft/Referenz |
|---------|-----------------|----------------------------------|
| BALB/c | BALB/cAnNHsd | Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln |
| BALB/b | BALB.B/OlaHsd | Harlan Winkelmann GmbH |
| BALB/k | BALB.K/OlaHsd | Harlan Winkelmann GmbH |
| C57BL/6 | C57BL/6NHsd | Harlan Winkelmann GmbH |

1.4 Plasmide

Tab. 5: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Genotyp | Herkunft/Referenz |
|------------|---|-------------------------------|
| pQE30 | Ap ^R , Expressionsvektor | Qiagen |
| pCR 2.1 | Ap ^R , Km ^R , <i>high-copy-number</i> Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten | Invitrogen, Leek, Niederlande |
| pET23 (a+) | Ap ^R , Expressionsvektor | Novagen |
| pSTH2 | Ap ^R , pQE30-Derivat mit SfbI Sequenz, Nukleotide 274-1854 | Molinari <i>et al.</i> , 1997 |
| pSTH10 | Ap ^R , pQE30-Derivat mit SfbI Sequenz, Nukleotide 274-1257 | Molinari <i>et al.</i> , 1997 |

| Plasmid | Genotyp | Herkunft/Referenz |
|-----------|---|----------------------------------|
| pSTH12 | Ap ^R , pQE30-Derivat mit dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 1240-1854 | Molinari <i>et al.</i> , 1997 |
| pKSC8 | Ap ^R , pQE30-Derivat mit Fusion aus dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 274-1854 und dem Gen <i>ovalbumin</i> , Nukleotide 1-1158 | diese Arbeit |
| pKSC9 | Ap ^R , pQE30-Derivat mit Fusion aus dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 274-1257 und dem Gen <i>ovalbumin</i> , Nukleotide 1-1158 | diese Arbeit |
| pKSC10 | Ap ^R , pQE30-Derivat mit Fusion aus dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 1240-1854 und dem Gen <i>ovalbumin</i> , Nukleotide 1-1158 | diese Arbeit |
| pKSC20 | Ap ^R , pET23 (a+)-Derivat mit Fusion aus dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 274-1854 und dem Gen <i>ovalbumin</i> , Nukleotide 1-1158 | diese Arbeit |
| pKSC21 | Ap ^R , pET23 (a+)-Derivat mit Fusion aus dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 274-1257 und dem Gen <i>ovalbumin</i> , Nukleotide 1-1158 | diese Arbeit |
| pKSC22 | Ap ^R , pET23 (a+)-Derivat mit Fusion aus dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 1240-1854 und dem Gen <i>ovalbumin</i> , Nukleotide 1-1158 | diese Arbeit |
| pKSC23 | Ap ^R , pET23 (a+)-Derivat mit dem Gen <i>sfbl</i> , Nukleotide 274-1854 | diese Arbeit |
| pKSC24 | Km ^R , pBK-CMV-Derivat mit dem Gen für Interleukin 2 | diese Arbeit |
| pKSC25 | Km ^R , pBK-CMV-Derivat mit dem Gen für Interleukin 5 | diese Arbeit |
| pKSC26 | Ap ^R , pCMV-β-Derivat mit dem Gen <i>tgf-β</i> | diese Arbeit |
| pKSC27 | Ap ^R , pcDNA3-Derivat mit dem Gen für Interleukin 12 | diese Arbeit |
| pKSC28 | Ap ^R , pCMV-β-Derivat mit dem Gen für Interleukin 12 | diese Arbeit |
| pVDL9.3 | Cm ^R , pHS575-Derivat mit einem Segment des <i>hly</i> -Operons | Tzschaschel <i>et al.</i> , 1996 |
| pTZ11b | Ap ^R , pUC18-Derivat mit dem Gen <i>sltIIeB</i> | Tzschaschel <i>et al.</i> , 1996 |
| pLG612-1B | Ap ^R , pLG612-1-Derivat | Tzschaschel <i>et al.</i> , 1996 |

2. Chemikalien, Enzyme und andere Materialien

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland), die verwendeten Lösungsmittel von der Firma J.T.Baker (Deventer, Niederlande), die Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB; Schmalbach, Deutschland) und die Medien für Bakterien von Difco (Detroit, MI, USA) bezogen.

Tab. 6: Verwendete Chemikalien

| Chemikalien | Hersteller |
|--|------------------------------|
| Acrylamid / Bisacrylamid (30%:0,8%) | Roth, Karlsruhe |
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Roth |
| Ammoniumpersulfat (APS) | BioRad, München |
| Ampicillin | Merck |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Sigma |
| Chromatographiepapier 3MM | Whatman, Maidstone, England |
| Coomassie R-250 Brilliant Blue | Sigma |
| Deaza G/A ^{T7} Sequencing Mixes Kit | Pharmacia, Uppsala, Schweden |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Merck |
| dNTPs (dCTP, dATP, dTTP; dGTP) | MBI Fermentas, Litauen |

| Chemikalien | Hersteller |
|---|------------------------|
| EDTA (Ethylendiamintetraacetat) | Serva, Heidelberg |
| Entwickler für Röntgenfilme | Kodak, Stuttgart |
| Essigsäure p.a. | Merck |
| Ethidiumbromid | Roth |
| Fixierer für Röntgenfilme | Kodak |
| Harnstoff | Riedel-de Haën, Seelze |
| IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) | BioRad |
| Isopropanol | Merck |
| Kanamycin | Sigma |
| Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm | Kodak |
| β-Mercaptoethanol | Merck |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Sigma |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Fluka |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) | Roth |
| Tween 20 | Merck |
| Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂) | Merck |

2.2 Membranen

Tab. 7: Verwendete Membranen

| Membran | Hersteller |
|---|----------------------|
| Pure Nitrocellulose Membrane | Sartorius, Göttingen |
| Filter Typ VS 0,025 µm | Millipore, Eschborn |
| Visking Dialyseschlauch 20/32 16mm Ø, MWCO 12-14kDa | Serva |
| Visking Dialyseschlauch 20/32 16mm Ø, MWCO 12-19kDa | Medicell, London |

2.3 Enzyme

Tab. 8: Verwendete Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|--------------------|---------------------|
| Restriktionsenzyme | New England Biolabs |
| T4-DNA-Ligase | New England Biolabs |

2.4 Kommerzielle Kits

Tab. 9: Verwendete Kits

| Kit-Bezeichnung | Hersteller |
|--|-------------------------|
| B-PER™ 6xHis Fusion Protein Purification Kit | PIERCE, Rockford |
| ECL Western Blotting Kit | Amersham-Buchler |
| Jetsorb Gel Extraction Kit | Genomed, Bad Oeynhausen |
| Original TA-Cloning Kit | Invitrogen |

| Kit-Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Qiagen Spin Plasmid Kit | Qiagen |
| Qiagen Midi Spin Plasmid Kit | Qiagen |
| Qiagen Nucleotide Removal Kit | Qiagen |
| QiaQuick PCR Purification Kits | Qiagen |
| Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems, CA, USA |
| MiniMacs Separation System | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |

2.5 Kommerzielle Antikörper und Seren

Tab. 10: Verwendete kommerziell erwerbbare Antikörper und Seren

| Antikörper | Hersteller |
|---|----------------------|
| fötales Kälberserum (FCS) | Gibco |
| Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) | Dianova, Hamburg |
| Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG + IgM (H + L) | Dianova |
| Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti- Ziege IgG | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgA | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgM | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG1 | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG2a | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG2b | Sigma |
| Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG3 | Sigma |
| Ziege-anti-Maus IgA | Sigma |
| Ziege-anti-Maus IgG1 | Sigma |
| Ziege-anti-Maus IgG2a | Sigma |
| Ziege-anti-Maus IgG2b | Sigma |
| Ziege-anti-Maus IgG3 | Sigma |
| gereinigtes Maus IgA | Sigma |
| gereinigtes Maus IgG1 | Sigma |
| gereinigtes Maus IgG2a | Sigma |
| gereinigtes Maus IgG2b | Sigma |
| gereinigtes Maus IgG3 | Sigma |
| Ratte-anti-Maus L3T4-konjugierte Microbeads | Miltenyi Biotec GmbH |
| Ratte-anti-Maus Ly-2-konjugierte Microbeads | Miltenyi Biotec GmbH |
| Ratte-anti-Maus B220-konjugierte Microbeads | Miltenyi Biotec GmbH |
| Kaninchen anti-Ovalbumin | Sigma |
| Alkalische Phosphatase konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG | Dianova |

2.6 Nicht-kommerzielle Antikörper und Seren

Polyklonale Antikörper gegen das SfbI Protein von *S. pyogenes* wurden wie bei Molinari *et al.* (1997) beschrieben erzeugt.

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco synthetisiert.

Tab. 11: Verwendete Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz 5' → 3' | Referenz |
|-------------|---|--------------|
| KSC1 | GCTGGATCCATGGGCTCCATCGGCGCAGCAAGC | diese Arbeit |
| KSC2 | AGCAGATCTACCAGAGCCAGAACCAGGGGAAAC ACATCTGCCAAAGAAG | diese Arbeit |

3. Nährmedien, Supplemente, Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Komponenten in deionisiertem Wasser gelöst. Die Nährmedien wurden vor Verwendung 20 min bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlen auf etwa 50°C mit den angezeigten Supplementen versetzt. Feste Medien wurden durch den Zusatz von 2% (w/v) Agar zur Nährlösung hergestellt. In Selektionsmedien wurden die in 3.3. angegebenen Antibiotika eingesetzt.

3.1 Nährmedien für Bakterien

SOC-Medium

| | |
|--------|-------------------|
| 2 % | Trypton |
| 0,5 % | Hefeextrakt |
| 10 mM | NaCl |
| 2,5 mM | KCl |
| 10 mM | MgCl ₂ |
| 10 mM | MgSO ₄ |
| 20 mM | Glucose |

Eine aus 1 M MgCl₂ und 1 M MgSO₄ hergestellte 1 M Mg₂₊-Stammlösung wurde sterilfiltriert und wie die sterilfiltrierte 2 M Glucose-Stammlösung jeweils 1:100 dem autoklavierten Teilmedium hinzugefügt.

Luria-Bertani (LB) -Medium, Sambrook *et al.* (1989)

| | | |
|------------|------------------|--------|
| 10 g | NaCl | |
| 5 g | Hefeextrakt | |
| 10 g | Trypton | |
| ad 1000 ml | H ₂ O | pH 7,5 |

THY-Medium

| | |
|------------|-------------------|
| 36,4 g | Todd-Hewitt Broth |
| 5 g | Hefe-Extrakt |
| ad 1000 ml | H ₂ O |

3.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen

Für die Anzucht der eukaryontischen Zelllinien EL4 und P815 und den aus der Maus isolierten Zellen wurde, wenn nicht anders angegeben, RPMI 1640 der Firma Gibco mit dem Zusatz von 50 ml hitzeinaktiviertem FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin [5000 IU/ml und 5000 µg/ml] und 5 ml 200 mM Glutamin auf 500 ml Medium verwendet. Das Zellkulturmedium wurde vor Gebrauch stets auf 37°C vorgewärmt.

3.3 Antibiotika

Die in Tab. 11 angezeigten verwendeten Stammlösungen wurden sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 12: Verwendete Antibiotika

| Antibiotika | Konzentration der Stammlösung | Lösungsmittel | Endkonzentration |
|----------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| Ampicillin (Ap) | 100 mg/ml | H ₂ O | 100 µg/ml |
| Kanamycin (Km) | 50 mg/ml | H ₂ O | 100 µg/ml |
| Chloramphenicol (Cm) | 30 mg/ml | Ethanol (96%) | 30 µg/ml |

3.4 Lösungen und Puffer

Die Bestandteile wurden in H₂O gelöst und der pH-Wert eingestellt.

10x PBS (Phosphat-gepufferte Saline)

| | | |
|------|-----|--|
| 80 | g/l | NaCl |
| 2 | g/l | KCl |
| 14,3 | g/l | Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O |
| 2 | g/l | KH ₂ PO ₄ |

pH 7,4

Der pH-Wert lag bei 7,4 und wurde nicht weiter verändert.

50x TAE

| | | |
|------|------|---------------------|
| 242 | g/l | Tris-Base |
| 57,1 | ml/l | Essigsäure |
| 100 | ml/l | 0,5 M EDTA (pH 8,0) |

pH 8,0

10x TBS (Tris-gepufferte Saline):

| | | |
|------|-----|-----------|
| 117 | g/l | NaCl |
| 60,6 | g/l | Tris-Base |

pH 7,6

TBS-T

TBS und Zugabe von

| | | |
|---|------|----------|
| 1 | ml/l | Tween 20 |
|---|------|----------|

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

pH 8,0

4. Kultivierung und Lagerung von Zellen**4.1 Kultivierung und Stammkonservierung von Bakterien**

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in den unter 3.1. beschriebenen Nährmedien. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verschiedenen Stämme in LB-Medium kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 30°C oder 37°C und im Schüttler (150 rpm) inkubiert.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden Bakterien spätestens nach 3 Wochen auf frische Agarplatten überimpft.

Zur Herstellung von Stammkulturen zur langfristigen Lagerung wurde ein über Nacht bei indizierter Temperatur auf LB-Agar (ggf. mit Antibiotikum) angewachsener Bakterienrasen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und dann bei -70°C eingefroren.

Einfriermedium

1% (w/v) Casaminosäure
10% (v/v) Glycerin

Zur Reaktivierung eines konservierten Stammes wurde ein Ausstrich auf einer LB-Platte (ggf. mit Antibiotikum) vorgenommen.

4.2 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Gewebekulturschalen in einem Zellkulturbrutschrank - wie unter 3.2 angegeben - in RPMI 1640 mit 10% (v/v) FCS, 5% (w/v) Penicillin/Streptomycin und 5% (w/v) Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und nach Bildung eines Monolayers wurden die Zellen passagiert. Aliquots wurden in neuen Gewebekulturschalen 1:3 mit frischem Zellkulturmedium versetzt.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen einer konfluent gewachsenen Platte nach dem Ablösen in 40 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert (GPR-Zentrifuge, Beckman). Die pelletierten Zellen wurden in 4 ml FCS mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in 500 µl Aliquots (10⁶-10⁷ Zellen/ml) in einem Einfrierautomaten auf -70°C abgekühlt (Firma Cryosom; Standard Einfrierprogramm für Lymphozyten; im Durchschnitt -2°C pro Minute). Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Reanimierung wurde ein Aliquot im 37°C warmen Wasserbad erwärmt und in vorgewärmtes Medium überführt.

5. Arbeiten mit DNA

5.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA

5.1.1 Mini- und Midipräparation von Plasmiden

Für die Plasmidisolierung zum Zwecke von Restriktionsverdau oder Screening nach Klonen wurden 4 ml einer bakteriellen Übernachtskultur in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 500 µl STET-Lösung resuspendiert und nach Zugabe von 40 µl frischer Lysozym-Lösung [10 mg/ml in Tris-Cl (pH8,0)] für 3 Sekunden gut durchmischt.

STET

| | |
|----------|------------------|
| 0,1 M | NaCl |
| 10 mM | Tris/HCl, pH 8,0 |
| 1 mM | EDTA, pH 8,0 |
| 5% (v/v) | Triton X-100 |

Die Suspension wurde für etwa 40 Sekunden in kochendem Wasser inkubiert und das Bakterienlysate anschließend bei 12000 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mittels eines Zahnstochers entfernt und die DNA durch Zugabe von 60 µl Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl Isopropanol für 5 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 x g und RT für 5 min wurde der Großteil des Überstandes zunächst vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und der Rest schließlich mittels einer SpeedVac (Savant) oder an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und nach einem weiteren zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 x g erneut getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 30-50 µl TE (pH 8,0) oder alternativ in H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Für die Sequenzierung von Plasmiden und für die Transformation von Plasmiden wurde die Plasmidaufreinigung mit dem Qiagen Spin Plasmid Kit gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

Plasmidisolierungen im Midi-Präp-Maßstab erfolgten mit dem Qiagen Midi Spin Plasmid Kit gemäß den Herstellerangaben.

5.1.2 Entsalzung mittels Dialyse

Vor der Sequenzierung wurde die DNA entsalzt, indem die DNA-Lösung auf einen Dialysefilter (Millipore VS-Filter, Porendurchmesser 0,025 µm) aufgetropft wurde, der sich in einem mit Wasser gefüllten *Well* einer 24-*Well* Platte befand. Nach 20 min Inkubation wurde die DNA-Lösung vorsichtig mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

5.2 Analyse von DNA-Präparationen

5.2.1 Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Für routinemäßige Auftrennungen von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele in Tris/Acetat-EDTA (TAE) in Minigelkammern (Horizon 58, Gibco BRL, England) eingesetzt.

Die DNA-Proben wurden mit etwa 1/6 Volumenanteil DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. DNA-Moleküle in Minigelen wurden in der Regel 1h bei einer Spannung von 90 V aufgetrennt. Zur Färbung der DNA-Banden wurde das Gel 5-20 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) geschwenkt. Die DNA-Banden wurden bei 253 nm auf einem UV-Tisch (Herolab UVT 2020) detektiert und mit dem EASY-System (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

DNA-Ladepuffer

0,25% (w/v) Bromphenolblau

0,25% (w/v) Xylencyanol FF

30% (v/v) Glycerin

Die Komponenten wurden in 1x TAE-Puffer gelöst.

5.2.2 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Bestimmung der Größe eines DNA-Fragmentes erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Als Größenvergleich diente eine 1 kb-Leiter (NEB, Schwalbach) oder ein Ladder Mix von 100 bp-10 kb (MBI Fermentas, Lithuania), die neben dem zu bestimmenden Fragment aufgetrennt wurden. Durch Vergleich der Wanderungsstrecken konnte die Fragmentgröße abgeschätzt oder mittels halblogarithmischer Auftragung der DNA-Fragmentgrößen der Marker-DNA gegen die Laufstrecke des zu bestimmenden DNA-Fragments genauer bestimmt werden.

5.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach erfolgter Auftrennung im Agarosegel und kurzer Anfärbung im Ethidiumbromidbad auf dem UV-Tisch ausgeschnitten mittels des Jetsorb Gel Extraction Kits (Genomed) gemäß den Angaben des Herstellers aus der Agarose aufgereinigt. Die Resuspension der DNA erfolgte in TE-Puffer oder alternativ in H₂O.

5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurden durch photometrische Messung der OD₂₆₀ nm bzw. OD₂₈₀ nm bestimmt. OD₂₆₀ nm = 1 entspricht 50 µg dsDNA/ml bzw. 38,5-40 µg ssDNA/ml (Davis *et al.*, 1980; Sambrook *et al.*, 1989). Für reine DNA-Lösungen gilt OD₂₆₀ nm : OD₂₈₀ nm = 1,000 : 0,556. Niedrigere Quotienten signalisieren die Verunreinigung durch Proteine.

5.3 Modifizierung von DNA

5.3.1 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers unter Verwendung der empfohlenen Puffer. Ein Standardansatz enthielt:

| | | |
|------------------------|-------|---------------------|
| DNA | 0,3-2 | µg |
| 10x Restriktionspuffer | 2 | µl |
| Enzym (10 units/µ l) | 0,5-1 | µl |
| | ad 20 | µl H ₂ O |

5.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Um den Anteil rezirkularisierter Vektor-DNA nach einer Ligation zu verringern, wurde die enzymatische Abspaltung der endständigen Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Nach vollständiger Restriktion der DNA wurden 10 µl 10x Dephosphorylierungspuffer zugegeben und mit H₂O auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Der Ansatz wurde nach Zugabe alkalischer Phosphatase mit 0,5 U/µg DNA bei 5'-Überhängen oder 1 U/µg DNA bei 3'-Überhängen für 10 min bei 37°C und 10 min bei 55°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe alkalischer Phosphatase und gleichen Inkubationsintervallen wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Vol EDTA (0,5 M, pH 8,0) und einer Inkubation von 10 min bei 75°C gestoppt. Der Ansatz wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion (5.3.3) und anschließender Ethanol-Präzipitation (5.3.4) unterzogen. Alternativ wurde die DNA bei geringen Mengen mittels des Nucleotide Removal Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

5.3.3 Reinigung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Extraktion von Proteinen wurde die DNA-Suspension mit dem gleichen Volumen Tris-gesättigten Phenols ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte 60 s bei 13000 rpm. Ebenso wurde der jeweilige Überstand einer Zentrifugation mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Der DNA-haltige Überstand wurde einer Ethanol-Fällung (5.3.4) unterzogen.

5.3.4 Ethanol-Präzipitation

Zum Ausfällen von DNA aus wässrigen Lösungen wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 6,5 und 2 Volumen 96% (v/v) Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde 2 h bei -70°C inkubiert und die DNA 1 h bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, Vakuum getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder alternativ in H₂O resuspendiert.

5.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers, wobei das zu klonierende DNA-Fragment in einem 2-4fach molaren Überschuss gegenüber dem Vektor zugegeben wurde.

5.4 Herstellen und Transformation elektrokompenter Zellen

Elektrokompente Bakterien wurden nach dem folgenden Protokoll hergestellt. 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 2,5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 30 min auf Eis gekühlt und die Bakterien durch Zentrifugation in einem GSA-Rotor für 15 min bei 4000 rpm ($2610 \times g$) und 4°C geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und die Bakterien im gleichen Volumen eiskalten H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (o.) wurde der Überstand sofort vorsichtig dekantiert und das Pellet in 0,4 Vol eiskaltem H₂O resuspendiert. Es folgte wiederum ein Zentrifugationsschritt (o.), nach dem das Pellet nun mit 0,02 Vol eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen wurde. Nach einem letzten Zentrifugieren (o.) wurde das Zellpellet anschließend in 0,002 Vol eiskaltem 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, in Aliquots à 40 µl in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Transformation elektrokompenter Zellen erfolgte nach Zugabe von 1-5 µl Ligationansatz (ca. 1 µg DNA) zu einem Aliquot auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien. Das Gemisch wurde unter Ausschluss von Luftblasen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite überführt. Die Transformation erfolgte mit dem Gene-Pulser und dem Gene-Puls-Controller (BioRad) durch einen elektrischen Impuls (25 µF, 2,5 V, 200 W). Sofort danach wurden 400 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und die Suspension zur Regeneration und Expression plasmidkodierter Resistenzen für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit Selektivmedium plattiert. Die Bestätigung positiver Klone erfolgte durch K-PCR (5.5.1) oder Analyse der enthaltenen Plasmid-DNA (5.1.1 und 5.3.1).

5.5 Polymerase-Chain Reaction (PCR)

5.5.1 PCR und Kolonie-PCR

Die PCR diente zur Amplifizierung von DNA zum Zwecke der Klonierung, Sequenzierung und dem Nachweis von Genotypen. Die Template-DNA für einen PCR-Ansatz wurde entweder durch Plasmidpräparation (5.1.1) gewonnen oder indem eine vereinzelte Bakterienkolonie in 500 µl H₂O resuspendiert, für 10 min bei 95°C inkubiert und abzentrifugiert wurde. Etwa 100 ng Plasmid-DNA aus der Plasmidpräparation, bzw. 10 µl des Lysatüberstandes wurden im PCR-Ansatz eingesetzt. Die spezifischen Oligonukleotide wurden von der Firmen Gibco (Gibco BRL, England) synthetisiert.

Für einen PCR-Ansatz wurden die Komponenten des GeneAmp® PCR Reagent Kit (Perkin Elmer) verwendet.

PCR-Ansatz

| | | | |
|------|-------|------|-------------------------|
| | 100 | ng | Plasmid-DNA |
| oder | 10 | µl | Bakteriensuspension |
| | 20-25 | pmol | je Primer |
| | 5 | µl | 10x PCR-Puffer |
| | 1 | µl | dNTP-Mix (25 mM / dNTP) |
| | 0,3 | µl | Taq Polymerase |
| | ad 50 | µl | H ₂ O |

Der Ansatz wurde gemischt und mit ca. 50 µl Mineralöl (Nujol, Perkin Elmer) für die Thermocycler-Reaktion in einem Thermocycler (Landgraf TC Varius V) überschichtet. Die Bedingungen der Thermocycler-Reaktion richten sich unter anderem nach der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer (Annealing-Temperatur ca. 5-10°C unterhalb T_m). Die Schmelztemperatur wurde hier nach folgender Faustregel berechnet (Sambrook *et al.*, 1989):

$$T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$$

G, C, A, T: Anzahl der bindenden Nukleotide des verwendeten Oligonukleotids

Thermocycler-Reaktion

| | | |
|----------------------------|----------------------|---------------|
| 1. Segment (1 Zyklus): | 94°C, 120 s | Denaturierung |
| 2. Segment (25-30 Zyklen): | 94°C, 20 s | Denaturierung |
| | ca. 45-65°C, 30-60 s | Annealing |
| | 72°C, 120 s | Extension |
| 3. Segment (1 Zyklus): | 72°C, 600 s | Extension |
| 4. Segment (Hold): | 15°C | |

Nach Abschluss der Reaktion wurde der PCR-Ansatz durch das Öl hindurch abgezogen und 5 µl zur Kontrolle im Agarosegel aufgetrennt. Zur Entfernung von Oligonucleotiden und dNTPs konnten die PCR-Produkte mit dem QIAQuick PCR Purification Kit aufgereinigt werden.

5.5.2 Klonierung von PCR-Produkten

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden, erfolgte aus dem PCR-Reaktionsansatz in den High-Copy-Vektor pCR2.1 mit Hilfe des TA Cloning Kits (Invitrogen) nach den Angaben des Hersteller

PCR-Produkte, die mit anderen DNA-Polymerasen amplifiziert wurden, mussten durch das Anhängen von 3'-Adenin-Überhängen aktiviert werden. Hierzu wurden nach der PCR-Reaktion in einen PCR-Ansatz 1 U Taq-Polymerase und 1 µl 25mM dATP hinzugefügt und für 10 min bei 72°C inkubiert. Die adenylierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification Kits aufgereinigt und wurden wie oben beschrieben weiter prozessiert.

5.6 DNA-Sequenzierung mittels *Dye Terminator Cycle Sequencing*

Zur DNA-Sequenzierung wurde die Didesoxymethode nach Sanger *et al.* 1996 unter Verwendung des DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (ABI, Applied Biosystems) und mit einem Automatischen Sequenziergerät (Modell 373A, ABI) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template-DNA dienten aufgereinigte Plasmid-DNA (5.1.1) oder aus einem Agarosegel isolierte PCR-Produkte (5.2.3 und 5.5.1). Die Template-DNA wurde vor der Thermocycler-Reaktion für 30 min dialysiert (5.1.2). Die Thermocycler-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Landgraf TC Varius V) durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur etwa 10°C unter der Schmelztemperatur des verwendeten Primers gewählt wurde.

Premix

| | | |
|-----|----|-------------------------|
| 4 | µl | 5x TACS Puffer |
| 1 | µl | dNTP Mix |
| 1 | µl | DyeDeoxy A Terminator |
| 1 | µl | DyeDeoxy T Terminator |
| 1 | µl | DyeDeoxy G Terminator |
| 1 | µl | DyeDeoxy C Terminator |
| 0,5 | µl | AmpliTaq DNA Polymerase |

Sequenzier-Ansatz

| | | |
|-------|------|------------------|
| 8 | µl | Premix |
| 1 | µg | Template |
| 15 | pmol | Primer |
| 1 | µl | DMSO |
| ad 20 | µl | H ₂ O |

Ansatz mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet

DMSO wurde bei Ansätzen zugegeben, in denen die Bildung von Sekundärstrukturen vermindert werden sollte.

Thermocycler-Reaktion

| | | | |
|----------------------------|--------------|--------|---------------|
| 1. Segment (1 Zyklus): | 96°C, | 15 s, | Denaturierung |
| 2. Segment (25-30 Zyklen): | 96°C, | 15 s, | Denaturierung |
| | ca. 40-60°C, | 15 s, | Annealing |
| | 60°C, | 240 s, | Extension |
| 3. Segment (Hold): | 15°C | | |

Der Sequenzieransatz wurde nach der Thermocycler-Reaktion aufgereinigt, indem die DNA durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 50 µl Ethanol für 10 min auf Eis gefällt wurde. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde die DNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 3 µl Formamid/50 mM EDTA, pH 8,0 (5:1) gelöst und bis zur Gelelektrophorese bei -20°C gelagert. Vor der Auftragung auf das Gel wurde die DNA für 2 min auf 90°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

Die Gelelektrophorese wurde auf 5%igen Acrylamidgelen mit einem automatischen Sequenzierer (Modell 373A, ABI) durchgeführt und gemäß den Angaben des Herstellers ausgewertet.

6. Arbeiten mit Proteinen

6.1 Isolierung von His-Tag-Fusionsproteinen

Die Anzucht proteinüberexprimierender Bakterien wurde bei 30°C durchgeführt. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels des B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent der Firma PIERCE. Der Lösung wurde zur Inhibierung von Proteasen 1mM PMSF (in Isopropanol) zugefügt, und das Lysat wurde bis zur Proteinisolierung bei 4°C gelagert.

Vor der Anzucht und Isolierung in größerem Umfang wurden Vorversuche durchgeführt. Hierzu gehören das Screening von exprimierenden Bakterien im kleinen Maßstab und die Überprüfung der Lokalisation und Solubilität der überexprimierten Proteine. Sowohl die Waschpuffer als auch der Elutionspuffer wurden mit 1 mM PMSF versetzt. Die Fraktionen wurden manuell wie folgt aufgefangen:

20 ml Fraktion Durchfluss,
3x 2 ml und 1x 6 ml Fraktionen für das Waschen mit Waschpuffer 1 und 2
und 4x 1 ml Fraktionen bei der Elution.

Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert und positive Fraktionen wurden gegebenenfalls vereinigt. Nach der Konzentrationsbestimmung (6.2.) wurde die Proteinlösung aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Verwendung vergleichbarer Proteinmengen wurden die Konzentrationen von Proteinlösungen i.d.R. biochemisch quantifiziert.

6.2.1 Biochemische Quantifizierung

Proteinbestimmungen wurden mit dem Roti-Nanoquant-System (Roth) in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden jeweils 10 µl Proteinlösung einer Verdünnungsreihe vorgelegt und 200 µl des 1x Reagenz ergänzt. Nach 2-10 min Inkubation erfolgte die Proteinmessung mit Hilfe des "Emax precision microplate reader" (MWG Biotech) und der SoftmaxPro Software (V 1.20 für Windows, Mol. Dev. Corp., USA) bei einer Differenz der Wellenlängen 590 nm bis 405 nm. Die Eichgerade wurde bei jeder Messung erneut aus BSA-Lösungen von 50 µg/ml bis 500 µg/ml ermittelt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe des Programms SoftmaxPro errechnet.

6.2.2 Abschätzung im SDS-Polyacrylamidgel

Zur Konzentrationsbestimmung intakten Proteins in einer Lösung mit zum Teil bereits degradierten Proteins war das Roti-Nanoquant-Systems (6.2.1) ungeeignet. Daher wurde die Probe einer geeichten Reihe verschiedener BSA-Konzentrationen durch SDS-PAGE (6.3.1) und anschließender Coomassie-Färbung gegenübergestellt und schließlich die Quantifizierung nach Einscannen des Gels mit dem Densitometer G-700 (BioRad) mit Hilfe des Programms Multi-Analyst (BioRad) durchgeführt.

6.3 Nachweis von Proteinen

6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Herstellung der vertikalen Gele und der anschließenden Elektrophorese wurden Minigelapparaturen (Biometra, Göttingen) verwendet. Bis auf TEMED wurden die Reagenzien für das Trenngel zusammengegeben und gut durchmischt. Der Start der Polymerisation erfolgte nach Zugabe von TEMED und das Gemisch wurde bis etwa 1,5 cm unterhalb der kleineren Glasplatte gegossen. Zur Begradigung der Geloberfläche wurde das noch nicht polymerisierte Gel mit 70% (v/v) Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Ethanol dekantiert. Das Sammelgel wurde in gleicher Weise

angesetzt und über das Trenngel gegossen. Mittels eines Kamms, der in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt wird, wurden die Geltaschen erzeugt.

Nach Montage der mit Gel gefüllten Glasplatten an das Biometra System wurde der SDS-Laufpuffer in die Vorratskammern gefüllt und die Kämme vorsichtig entfernt. Die zu testenden Proteinproben wurden im gleichen Volumen SDS-Probenpuffer (2x) aufgenommen und 10 min bei 95°C erhitzt, um sie vollständig zu denaturieren. Unmittelbar vor Auftragung der Proben wurden die Geltaschen gegebenenfalls mit Puffer gespült. Die Elektrophorese im Anschluss an die Auftragung sämtlicher Proben erfolgte bis zum Einwandern der Farbbande in das Trenngel bei 20 mA/Platte, anschließend bei 30 mA/Platte. Die Elektrophorese wurde i.d.R. bis zum Austreten der Bromphenolblaubande aus dem Gel durchgeführt. Danach wurde das Gel entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (6.3.2) oder für die Western Blot Analyse (6.3.3) weiterbehandelt. Als Molekulargewichtsstandard dienten vorgefärbte Proteinstandards der Firma BioRad. Die Größen der einzelnen Standardproteine konnten von *batch* zu *batch* des Herstellers variieren, weshalb relevante Größen stets bei den SDS-Gel-Abbildungen vermerkt sind.

| | |
|-------------------------|------------------------|
| Trenngel-Puffer | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 |
| Sammelgel-Puffer | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 |

Trenngel

| Gelstärke | 7,5% | 10% | 12,5% | 15% |
|------------------|--------|--------|---------|---------|
| H ₂ O | 3 ml | 2,5 ml | 1,75 ml | 1,45 ml |
| Trenngel-Puffer | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |
| Acrylamid | 1,5 ml | 2 ml | 2,75 ml | 3 ml |
| 10% (w/v) SDS | 60 µl | 60 µl | 60 µl | 60 µl |
| 10% (w/v) APS | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 8 µl |
| TEMED | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 8 µl |

Sammelgel

| alle Gelstärke | |
|------------------|---------|
| H ₂ O | 1,2 ml |
| Sammelgel-Puffer | 320 µl |
| Acrylamid | 330 µl |
| 10% (w/v) SDS | 25 µl |
| 10% (w/v) APS | 12,5 µl |
| TEMED | 2,5 µl |

SDS-Probenpuffer (2x)

| | | |
|------|----|-------------------|
| 60 | mM | Tris-HCl |
| 10 | % | Glycerin |
| 1 | % | SDS |
| 1 | % | β-Mercaptoethanol |
| 0,01 | % | Bromphenolblau |

SDS-Laufpuffer

| | |
|--------|--------------|
| 25 mM | Tris, pH 8,3 |
| 200 mM | Glycin |
| 0,1 % | SDS |

6.3.2 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Gel nach der Elektrophorese (5.2.1) entweder über Nacht bei RT oder für 1 h bei 37°C in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mehrere Stunden im Entfärber geschwenkt, bis der Hintergrund entfärbt war. Die gefärbten Gele wurden mittels eines GelAir Dryers (BioRad) in Cellophan (Cellophane Support, BioRad) eingeschweißt und so konserviert.

Coomassie-Färbelösung

| | |
|--------|----------------------|
| 1 g | Coomassie R-250 Blue |
| 100 ml | Essigsäure |
| 400 ml | H ₂ O |
| 500 ml | Methanol |

Entfärber

| | |
|--------|------------------|
| 500 ml | Methanol |
| 75 ml | Essigsäure |
| 425 ml | H ₂ O |

6.3.3 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (6.3.1.) aufgetrennt und das SDS-Gel mindestens 20 min in Blotpuffer inkubiert. Für jedes Gel wurden 4 Whatman-Papiere und ein auf die Größe des Gels zugeschnittene Nitrocellulose-Membran mit inkubiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte im Anschluss mittels der Semi Dry Blotting-Apparatur (BioRad) für 20 min bei 15 V. Hierfür wurden zwei Lagen in Blotpuffer getränktes Whatman-Papier blasenfrei auf die Kathode des Gerätes gelegt, hierauf wurden die äquilibrierte Membran, das äquilibrierte SDS-Gel und zwei weitere Lagen getränkten Filterpapiers ebenfalls luftblasenfrei platziert. Die Membran wurde nach dem Transfer direkt für den Nachweis der Proteine verwendet.

Blotpuffer

| | |
|--------|----------|
| 25 mM | Tris-HCl |
| 192 mM | Glycin |
| 20 % | Methanol |
| | pH 8,3 |

Zum chemiluminiszenten Nachweis der geblotteten Proteine wurde die Membran in PBS mit 5% Frischmilch (0,3% Fett) über Nacht bei 4°C und – wie bei allen folgenden Schritten – unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit dem ersten, Protein spezifischen Antikörper in TBS-T mit 1% Milch (Verdünnung 1:1000 bis 1:2000) inkubiert. Nach zweifachem Spülen und 2 Waschschr

für je 5 min mit TBS-T wurde der zweite Antikörper (Horseradish Peroxidase konjugierte Anti-Kaninchen-IgG und -IgM, BioRad) in TBS-T verdünnt (1:5000) auf die Membran gegeben und es wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blot wiederum nach zweifachem Spülen dreimal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham), wobei die Entwicklung des Blots gemäß den Herstellerangaben erfolgte.

7. Immunologische Methoden

7.1 Immunisierung von Mäusen

7.1.1 Immunisierung zur Charakterisierung der Immunantwort

Für die Charakterisierung der durch das Antigen hervorgerufenen Immunantwort wurden die Mäuse intranasal immunisiert. Hierzu wurden die Tiere mittels des Inhalations-Anästhetikums Metofane (Janssen-CILAG GmbH, Neuss) betäubt, und das in PBS gelöste bzw. gegen PBS dialysierte Antigen wurde mittels einer 20 µl-Pipette (Gilson) und besonders dünnen Pipettenspitzen der Firma BioRad (Prot/Elec Tips) zu gleichen Teilen in die Nasenlöcher gegeben. Das verabreichte Volumen lag zwischen 10-40 µl/Maus.

Die Mäuse wurden jeweils am Tag 1, Tag 7 und Tag 14 immunisiert. Je nach Ausmaß der stimulierten Immunantwort musste ggf. nach jeweils weiteren 7 Tagen ein dritter und vierter *Boost* gegeben werden. 10 Tage nach dem letzten *Boost* fand das Prozessieren der Tiere statt. Für die Charakterisierung des immunologischen Gedächtnisses wurden die Mäuse nach Gabe des zweiten *Boosts* an Tag 14 für 3 Monate belassen und erst dann prozessiert.

7.1.2 Immunisierung zur Analyse der Effizienz der mukosalen Impfung

Die Mäuse wurden wie unter 7.1.1 beschrieben intranasal immunisiert. Die Gabe der Antigene erfolgte am Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 26. Am Tag 36 wurden die Mäuse schließlich infiziert. Hierzu wurden jedem Tier 10^8 Bakterien in PBS intranasal verabreicht. Zur Vorbereitung des Inokulums wurde der *S. pyogenes* Stamm NS192 bei 37°C über Nacht ohne Schütteln in THY-Medium angezogen. Nach Abzentrifugieren, Resuspendieren und erneutem Abzentrifugieren wurde die Kultur schließlich in 500 µl PBS aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Transmission (10% Transmission = 5×10^8 Bakterienzellen/ml).

Zur Analyse der Effizienz des ausgebildeten immunologischen Gedächtnisses wurden die Mäuse erst 3 Monate nach Gabe des dritten *Boosts* infiziert.

7.2 Prozessieren der Mäuse

7.2.1 Markierung der Mäuse

Um die Mäuse innerhalb einer Gruppe unterscheiden zu können, wurden die Tiere durch Lochung der Ohren nach folgendem Schema markiert:

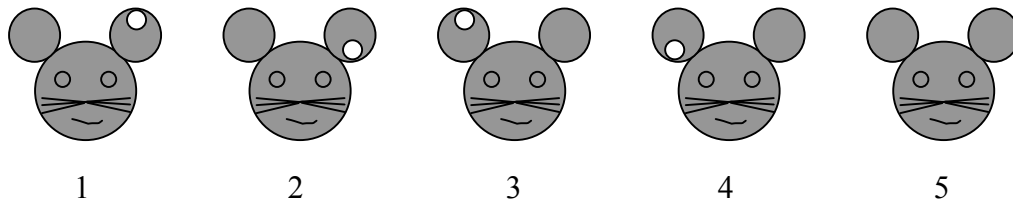


Abb.5: Markierungsschema der Mäuse. Die Ohren der Tiere wurden mit einer Zange gelocht.

7.2.2 Blutabnahme

Den Mäusen wurden vor jeder Immunisierung und jedem *Boost* zwischen 100 bis maximal 500 μ l Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die Tiere zunächst für einige Minuten unter Rotlicht belassen und dann in eine Plexiglasröhre gebracht, um sie zu fixieren. Mittels eines Skalpells (10 Cutfix; B.Braun Surgical GmbH, Melsungen) wurde schließlich ein kleiner Schnitt quer zur Vene durchgeführt und das Blut mit einer 200 μ l Pipette (Gilson) abgenommen und in ein 1,5 ml Safe-Lock Gefäß (Eppendorf) gegeben (Abb. 6).

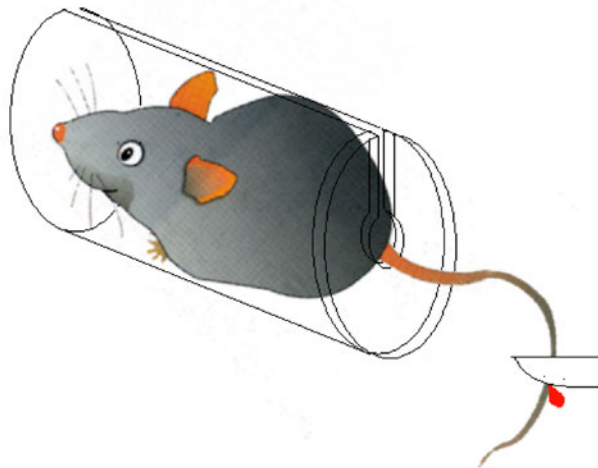


Abb.6: Blutabnahme aus der Schwanzvene

Um das Serum von den anderen Blutbestandteilen zu trennen, wurde das Blut für wenigstens eine Stunde bei 37°C und im Anschluss für wenigstens 30 min in Eis inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 min bei ca. 10000 x g zentrifugiert und das Serum wurde vorsichtig abpipettiert, in ein 0,5 ml Safe-Lock Gefäß (Eppendorf) gegeben und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.2.3 Isolierung von Milz und Lymphknoten der Maus

Vor dem Prozessieren der Mäuse wurden diese mit CO₂ getötet. Nach kurzem Einsprühen der Maus mit Ethanol (70%) wurde zunächst die Milz mit desinfiziertem Operationsbesteck entnommen. Dazu wurde die Bauchdecke mit einer Schere geöffnet, die Milz mit einer Pinzette gegriffen und vorsichtig mit einer Schere gelöst. Zur Entnahme der Lymphknoten an der Trachea wurde der Brustkorb der Maus entlang des Sternums vorsichtig mit einer Schere geöffnet. Die Trachea zusammen mit dem Larynx wurde nun mit einer Pinzette gehalten und beides oberhalb der Pinzette mit einer Schere durchtrennt. Als Nächstes wurde die Trachea vorsichtig nach vorn über das Herz gezogen, wodurch die Lymphknoten rechts und links an der Trachea sichtbar wurden. Die Lymphknoten müssen sehr vorsichtig entnommen werden, um nicht die Thymusdrüse zu verletzen, die zum Teil oberhalb des Herzens die Trachea umgibt. Pro Maus konnten i.d.R. 2 Lymphknoten entnommen werden.

Nach Entnahme der Organe wurden diese sofort in eine Petrischale mit Medium gegeben und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

7.2.4 Lungenwaschung

Für die Gewinnung sekretorischer IgA aus der Lunge wurde eine Lungenwaschung durchgeführt. Hierzu wurde ein kleiner Schnitt in der Mitte der Trachea zwischen zwei Ringen gesetzt, in den ein Katheter eingeführt wurde. Über diesen Katheter, ein etwa 1 mm starker Schlauch, der auf eine Kanüle gesteckt wurde, wurden zweimal 500 µl PBS mit 5% FCS mittels einer 1 ml Spritze (ERSTA Luer Tuberculin; CODAN Medical ApS, Rodby, Dänemark) in die Lunge gegeben. Nach kurzem Kneten des Brustkorbs wurde der Puffer mit einer zweiten Spritze wieder abgesogen und zusammen mit 10 µl 40 mM PMSF in ein 1,5 ml Gefäß gegeben. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten wurde der Überstand mit den sekretorischen IgA in ein neues 1,5 ml Gefäß gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

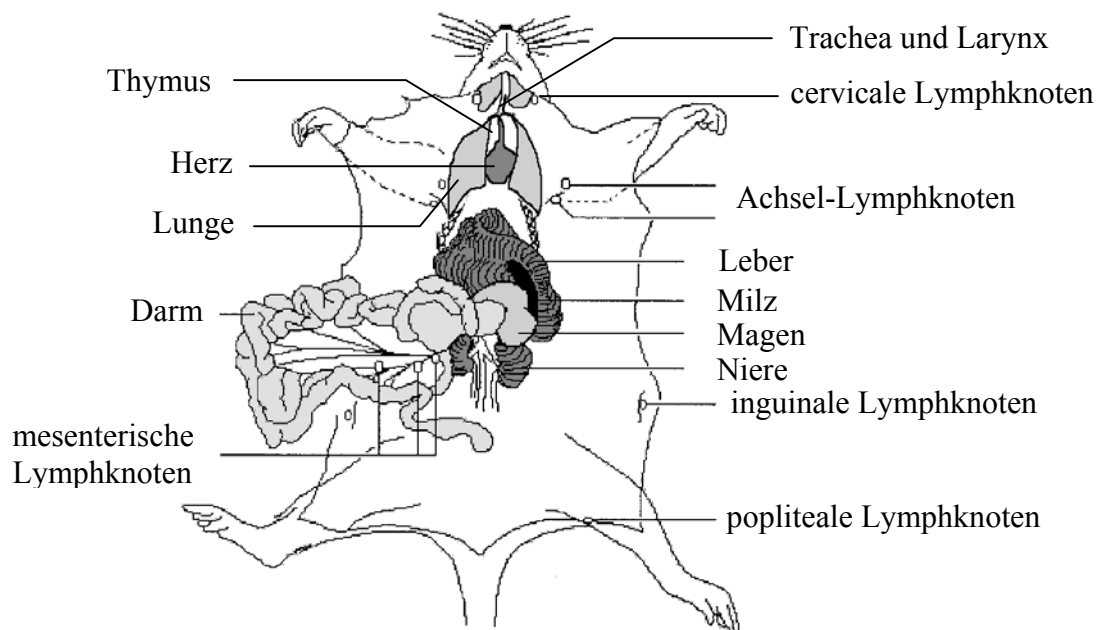


Abb.7: Mausanatomie, Lokalisation der Lymphknoten (modifiziert von *Current Protocols in Immunology*)

7.3 Immunochemische Techniken

7.3.1 T-Zell-Proliferations-Assay

Zur Präparation der T-Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden die Organe (bis zu 5 Milzen gleichzeitig) mittels eines Stempels mit Gummikopf vorsichtig durch ein Sieb (Screens 60 mesh, Sigma) in eine Petrischale gedrückt, nicht gerieben. Zwischendurch wurden die Organe immer wieder mit etwas Medium befeuchtet und die Zellen durch das Sieb gewaschen. Die Zellsuspension wurde schließlich in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und die Petrischale mehrfach mit frischem Medium gespült, um möglichst viele Zellen zu erhalten. Das 15 ml Röhrchen wurde zum Waschen bis oben mit Medium gefüllt und die Zellen bei 200 x g und RT zentrifugiert (GPR-Zentrifuge, Beckmann). Das Pellet der Milzzellen wurde in 8 ml Amoniumchlorid-Puffer (ACK-Puffer) zur Lyse der roten Blutkörperchen resuspendiert und für 5 min bei RT und wiederholtem Schütteln inkubiert.

ACK-Puffer

| | | | |
|-------------------|----------------------|------------|--|
| 8,29 g | NH ₄ Cl | | |
| 1 g | KHCO ₃ | 1 mM | |
| 37,2 mg | Na ₂ EDTA | 0,1 mM | |
| add 1 l | H ₂ O | | |
| | | pH 7,2-7,4 | |
| steril filtrieren | | | |

Die Lyse wurde durch Zugabe von 7 ml frischem Medium gestoppt und die Suspension für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in Medium wurde die Zellsuspension erneut durch ein Sieb gegeben und in einem 50 ml Röhrchen (Greiner) aufgefangen. Dieser Schritt diente dazu, Fettzellen und andere Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen.

Nach Bestimmung der Zellzahl durch Zählen unter dem Mikroskop mittels Trypan-Blau wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung in Eis gehalten. Jeweils 100 µl/*Well* dieser Zellsuspension wurden schließlich nach dem jeweiligen Pipettierschema auf einer 96-*Well* Mikrotiterplatte (TPP, Schweiz) verteilt. Nach Zugabe (100 µl/*Well*) unterschiedlicher Verdünnungen des Antigens, i.d.R. 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml bzw. für das Epitop-Mapping jeweils 10 µg eines Peptides pro *Well*, wurden die Zellen für 4 Tage bei 37°C und einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit ³H-Thymidin (1 µCi in 50 µl Medium pro *Well*) geladen und 18 h später mit Hilfe des Zell-Harvester Systems der Firma INOTECH geerntet. Schließlich wurde der Assay mittels des MicroBeta TriLux Counters (Wallac, Turku, Finnland) ausgewertet.

7.3.2 Deletion distinkter Zellpopulationen aus Zellgemischen

Die Deletion von bestimmten Zellpopulationen wie CD4- und CD8-T-Zellen oder B-Zellen aus Zellkulturen, die zuvor wie oben beschrieben aus Milzen gewonnen wurden, erfolgte mittels des MiniMacs Separation Systems der Firma Miltenyi Biotec Inc. Es wurden 10^7 Zellen der Mischkultur in 90 µl Medium resuspendiert und mit 10 µl der entsprechenden Microbeads (L3T4: CD4, Ly-2: CD8a, B220: CD45R) vermengt. Nach 15-minütiger

Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen, für 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und schließlich in 500 µl Separationspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun über die Magnetsäulen gegeben und die aufgefangenen Zellen auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml eingestellt.

7.3.3 Zytotoxizitäts-Assay (CTL)

Die Gewinnung der T-Zellen (Effektor-Zellen) aus Milz und Lymphknoten erfolgte wie unter 7.3.1 beschrieben. Nach Einstellen der Zellzahl auf 5×10^6 Zellen/ml wurden i.d.R. je 5 ml dieser Zellsuspension in drei 25 ml Zellkulturflaschen gegeben und zusammen mit dem in 5 ml Medium gelösten MHC Klasse I bindenden Peptid (40 µM) für 5 Tage bei 37°C und in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre stehend inkubiert. 24 h nach Präparation der Effektor-Zellen wurden vorsichtig 20 U/ml rekombinantes Interleukin 2 pro Flasche zugegeben. Die Zugabe des entsprechenden Peptides zusammen mit dem rekombinanten Interleukin 2 dient zur Stimulierung der klonalen Expansion der Effektor-Zellen. Im Anschluss an die fünftägige Inkubation wurden die Effektor-Zellen zusammen mit den Target-Zellen (Antigen präsentierende Zellen, je nach Mausstamm Zelllinie EL4 oder P815) inkubiert. Dazu wurden die Target-Zellen zunächst mit einem bekannten MHC I Epitop des Antigens beladen. 400 µl der Target-Zellen [2×10^6 /ml] wurden zusammen mit 500 µl des Peptides [40 µM] und 10 µCi ³H-Thymidin (in 100 µl Medium) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ in einer 24-Well-Platte belassen. Die Kontrolle wurde ohne Peptid inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in ein 15 ml Röhrchen überführt, für 10 min bei 200 x g zentrifugiert, zweimal mit jeweils 15 ml Medium gewaschen und letztlich auf eine Zellzahl von 2×10^5 /ml eingestellt. Je 100 µl der Target-Zell-Suspension wurden pro *Well* nach dem jeweiligen Pipettierschema auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit rundem Boden (Nunc, Roskilde, Dänemark) verteilt und zusammen mit den Effektor-Zellen in den Verhältnissen:

| Effektor | | Target |
|----------|---|--------|
| 0 | : | 1 |
| 6,25 | : | 1 |
| 12,5 | : | 1 |
| 25 | : | 1 |
| 50 | : | 1 |
| 100 | : | 1 |

für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zuvor wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 100 x g für 5 min verdichtet.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen wie unter 7.3.1 beschrieben geerntet und der Assay mit Hilfe des MicroBeta TriLux Counters (Wallac) ausgewertet.

7.3.4 Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA) zur Bestimmung Antigen-spezifischer IgG, IgA und IgM

Polysorb 96-Well Mikrotiterplatten (Greiner) wurden mit 50 µl/*Well* [2 µg/ml] des Antigens in Coating-Puffer bei 4°C über Nacht beschichtet.

Coating-Puffer

| | |
|---------|---------------------------------|
| 1,59 g | Na ₂ CO ₃ |
| 2,93 g | NaHCO ₃ |
| add 1 l | H ₂ O |

pH 9,6

Die Platte wurde dann viermal mit PBS/0,05% Tween20 (für alle Waschschritte verwendet) mit Hilfe eines ELISA-Washers 96 PW (Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich) gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte mit 200 µl/*Well* PBS/1% BSA überschichtet und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte zweimal gewaschen und 100 µl/*Well* einer Verdünnungsreihe der Seren in PBS/1% BSA zugegeben. In der Regel begann die Verdünnungsreihe mit einer 1:100-Verdünnung und wurde in 1:2-Verdünnungsschritten bis zu einer Verdünnung von 1:102400 weitergeführt. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht oder 2 h bei 37°C wurde erneut viermal gewaschen, bevor der zweite Antikörper, biotinyliertes anti-Maus IgG bzw. IgA oder IgM (1:20000-Verdünnung in PBS/1% BSA; 100 µl/*Well*), zugegeben wurde. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für 1 h wurde sechsmal gewaschen und die Platte wurde mit 50 µl/*Well* einer 1:1000-Verdünnung von Peroxidase gekoppeltem Streptavidin (Streptavidin-HRP, Pharmingen,) beschichtet. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei RT, nach der wiederum sechsmal gewaschen wurde, bevor 100 µl/*Well* des Substrats ABTS/H₂O₂ zugegeben wurden.

ABTS

| | |
|--------|---|
| 150 mg | 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure) Diammonium-Salz |
| 500 ml | 0,1 M Zitronensäure in ddH ₂ O |

pH 4,35

ABTS/H₂O₂

1 ml ABTS plus 1 µl 30% H₂O₂

Die Auswertung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 405 nm gegen 595 nm mit dem Microplate-Reader Emax (MWG Biotech) nach 30 bis 60 Minuten.

7.3.5 ELISA zur Bestimmung und Quantifizierung Antigen-spezifischer IgG-Isotypen

Zur Bestimmung der IgG-Isotypen wurden Polysorb 96-*Well* Mikrotiterplatten (Nunc) wie unter 7.3.4 beschrieben mit dem spezifischen Antigen beschichtet. Darüber hinaus wurden einige *Wells* für den Standard mit dem Antikörper (1:100-Verdünnung) gegen die jeweiligen IgG-Isotypen beschichtet. Der ELISA wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend viermal wie unter 7.3.4 beschrieben gewaschen. Nach der darauf folgenden Absättigung wurden die Seren in Verdünnungen 1:100, 1:1000, 1:5000 und 1:10000 (100 µl/*Well*) auf das Antigen und rekombinantes IgG1 (rIgG1) bzw. rIgG2a, rIgG2b oder rIgG3 in Konzentrationen von 500 ng/ml bis 1 ng/ml auf den entsprechenden Antikörper gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C, viermaliges Waschen und die Zugabe des zweiten, biotinylierten Antikörpers. Der ELISA wurde anschließend wie unter 7.3.4 beschrieben beendet und ausgewertet.

7.3.6 ELISA zur Quantifizierung Antigen-spezifischer IgA in Lungenwaschungen

Zur Bestimmung der Gesamtmenge an IgA wurden 96-Well Mikrotiterplatten mit 5 µg/ml (50 µl/Well) gereinigtem anti-Maus IgA bei 4°C über Nacht beschichtet. Nach viermaligem Waschen und anschließendem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen, wie unter 7.3.4 beschrieben, wurden 1:4-Verdünnungen (100 µl/Well) der Lungenwaschungen zugegeben. Als Standard diente aufgereinigtes IgA aus der Maus, welches in einer Verdünnungsreihe von 500 µg/ml bis 1 µg/ml (100 µl/Well) eingesetzt wurde. Es folgte Inkubation bei 37°C für 1 h, viermal waschen und die Zugabe des zweiten Antikörpers, einem biotinylierten anti-Maus IgA Antikörper. Der ELISA wurde anschließend wie unter 7.3.4 beschrieben beendet und ausgewertet.

Die Menge spezifischer IgA in den Lungenwaschungen wurde nach dem gleichen Protokoll bestimmt. Allerdings wurden hierbei die 96-Well Mikrotiterplatten mit 2 µg/ml (50 µl/Well) des Antigens bei 4°C über Nacht beschichtet und die Proben nur 1:2 verdünnt. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil spezifischer IgA an dem gesamten IgA berechnet.

7.3.7 ELISA zur Bestimmung Peptid-spezifischer IgG

Aufgrund der allgemein schwachen und zum Teil unterschiedlichen Bindungsaffinität von den verwendeten Peptiden zu Polysorb 96-Well Mikrotiterplatten (Greiner) wurden die gleichen Peptide biotinyliert eingesetzt. Diese wurden in der Konzentration 5 µg/Well in PBS/1% BSA auf mit Streptavidin vorbeschichtete Mikrotiterplatten (Reacti-Bind™ Streptavidin Coated Polystyrene 96-Well Plate, PIERCE) gegeben. Nach einer Inkubation für 2 h bei RT wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS/1% BSA (200 µl/Well) bei 37°C für 1 h abgesättigt. Wie bei allen weiteren Waschschritten auch wurde dann viermal mit PBS/1% BSA gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 1:50-Verdünnungen der Seren bei 37°C, erneutes Waschen und die Zugabe des zweiten Antikörpers (Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG + IgM (H + L), 1:5000, 100 µl/Well). Zur Verstärkung des Signals wurden nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C und Waschen drei weitere Peroxidase-konjugierte Antikörper (Kaninchen-anti-Ziege IgG, Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L), Kaninchen-anti-Ziege IgG) zugegeben. Die Antikörper wurden jeweils im Verhältnis 1:5000 und 100 µl/Well eingesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde der ELISA gewaschen. Vor Zugabe des Substrates ABTS und Auswertung wie unter 7.3.4 beschrieben wurde sechsmal gewaschen.

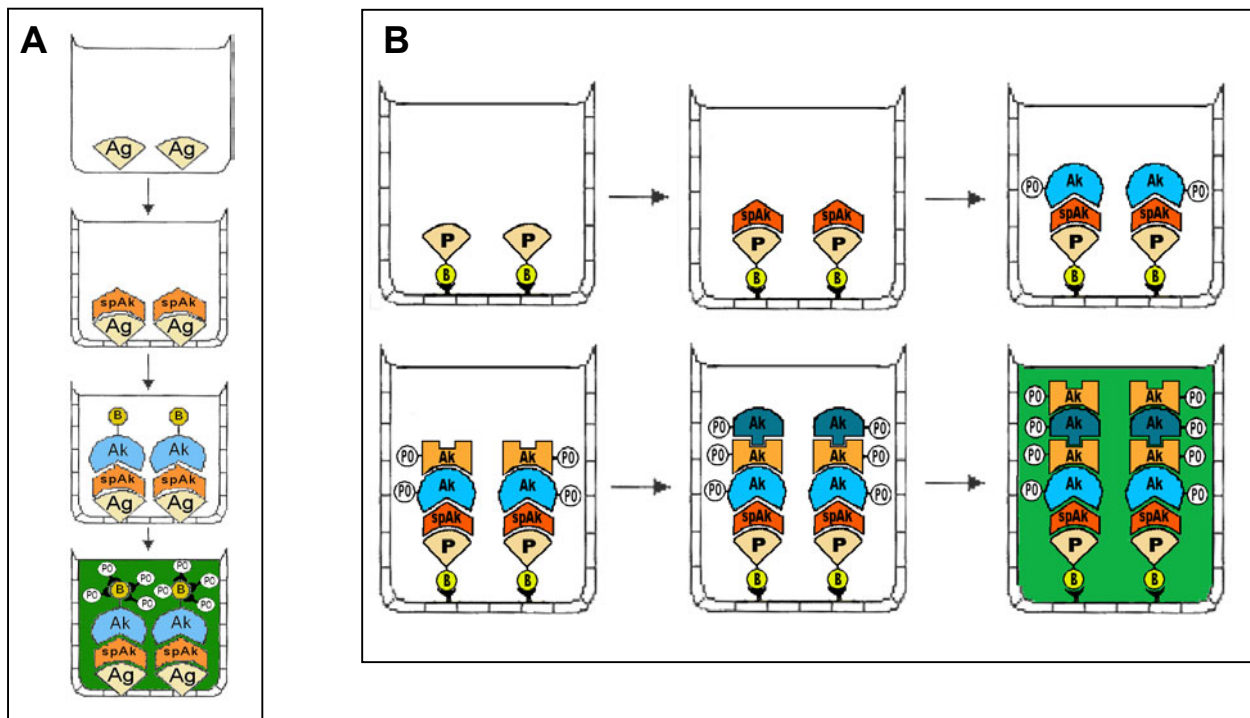


Abb.8: ELISA-Tests: (A) Standard-ELISA zur Bestimmung spezifischer Antikörper. (B) ELISA zur Bestimmung spezifischer Antikörper gegen Peptide. Ag = Antigen; Ak = Antikörper; B = Biotin; PO = Peroxidase; spAk = spezif. Antikörper

7.3.8 Antikörperbindungstest

Mit Peptiden beschichtete Nitrocellulosemembranen wurden zunächst mit etwas Ethanol angefeuchtet, um eine bessere Benetzung der Oberfläche mit Puffer zu gewährleisten. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Membranen über Nacht bei RT in 8 ml Blockingpuffer inkubiert.

Genosys-Blockingpuffer

- 2 ml Genosys-Blockingpuffer
- 8 ml T-TBS, pH 8
- 0,5 g Saccharose
- pH 7

Am nächsten Tag wurde nach einmaligem Waschen mit T-TBS zunächst untersucht, ob der zweite Antikörper (Alkalische Phosphatase konjugierte Ziege-anti-Maus IgG,) unspezifisch an den membrangebundenen Peptiden bindet. Hierzu wurde der Antikörper 1:500 in 8 ml des Blockingpuffers verdünnt und die Membran mindestens 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit T-TBS und anschließend zwei Waschschrte mit CBS. Die Detektion erfolgte schließlich durch Inkubation der Membran bei RT in 10 ml Färbelösung für 30 Minuten.

CBS

8 g NaCl
0,2 g KCl
2,1 g Zironensäure-1-hydrat
pH 7

Färbelösung

10 ml CBS
50 µl 1M MgCl₂
40 µl BCIP (6 mg in 100 µl DMF)
60 µl MTT (5 mg in 100µl 70%
DMF/30% H₂O)

Bei Ausbleiben einer Färbung wurden die ersten Schritte bis zur Zugabe des Antikörpers wiederholt. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Hierzu wurden die Mausseren 1:100 in 8 ml Blockingpuffer verdünnt und für mindestens 3,5 Stunden auf der Membran belassen. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit T-TBS gewaschen bevor die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte. Es wurde erneut zweimal mit T-TBS und zweimal mit CBS gewaschen bevor wie oben beschrieben die Detektion der spezifisch gebundenen Peptide erfolgte. Bei Beobachtung einer Färbung wurde kurz mit PBS gespült und einmal mit PBS gewaschen, um den Überschuss an Färbelösung herauszuwaschen. Die Membranen wurden schließlich mittels des Densitometers G700 der Firma Biorad eingescannt und die Auswertung erfolgte mittels des Programms MultiAnalyst.

8. Datenverarbeitung

Die Textverarbeitung erfolgte mit dem Programm Microsoft Word.

Die Tabellenkalkulationen wurden mit Microsoft Excel und statistische Auswertungen mit dem Programm STATGRAPHICS Plus for Windows™, Version 2.1 (Statistical Graphics Corp., <http://www.statgraphics.com>) durchgeführt.

Graphiken wurden mit Paint Shop Pro 6.02 (JascSoftware, Inc., Eden Prairie) erstellt und das Einscannen von Filmen und Gelen erfolgte mit Hilfe des Programms FotoLook 2.09 (AGFA).

III. Ergebnisse

1. Identifizierung der kleinsten Region des Fibronektin-Bindungsproteins SfbI von *S. pyogenes*, welche eine schützende Immunantwort stimuliert.

Obwohl Infektionen mit Gruppe A Streptokokken wie *S. pyogenes* mit Antibiotika behandelt werden können, konnte in den vergangenen Jahren eine Ausbreitung und die Zunahme gerade der schweren Folgeerkrankungen von Streptokokkeninfektionen beobachtet werden (Johnson *et al.*, 1992; Stevens, 1995). Die Entwicklung eines Impfstoffes ist daher unbedingt notwendig.

Frühere Studien haben gezeigt, dass das Oberflächenprotein SfbI von *S. pyogenes* in der Lage ist, Mäuse vor einer letalen Infektion mit diesem Pathogen zu schützen (Guzmán *et al.*, 1999). Probleme mit der Instabilität des Proteins sowohl bei der Aufreinigung als auch bei der Lagerung machten die Identifizierung der kleinst möglichen Region, welche eine schützende Immunantwort stimuliert, notwendig. Aus diesen Gründen wurden verschiedene Teilregionen und das gesamte Protein SfbI aufgereinigt und in Immunisierungsstudien eingesetzt.

1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung der SfbI-Derivate H2, H4, H8, H10 und H12 (Abb.9) wurden die verwendeten Expressionsvektoren pSTH2, pSTH4, pSTH8, pSTH10 und pSTH12 (Molinari *et al.*, 1997) in den *E.coli*-Stamm M15[pREP4] eingebracht. H2 besitzt alle distinkten Domänen mit Ausnahme des Signalpeptids und den Regionen des Zellwand- und Membranankers. Das Derivat H10 besteht aus der aromatischen Domäne und den prolinreichen *Repeats*. Beide Regionen sind durch den *Spacer 1* voneinander getrennt. Das dritte rekombinante Protein, H12, umfasst lediglich die Fibronektin-Bindungsdomäne, bestehend aus *Spacer 2* und den fibronektinbindenden *Repeats*. Die Derivate H4 und H8 stellen schließlich eine weitere Auftrennung der fibronektinbindenden Domäne (H12) in *Spacer2* (H4) und *Repeats* (H8) dar.

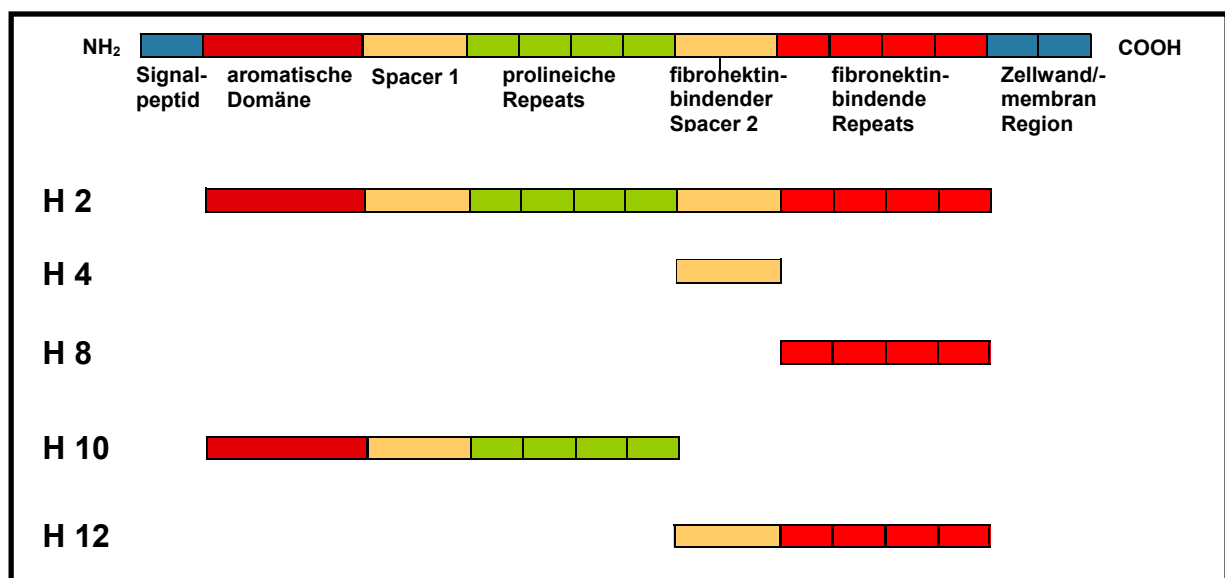


Abb.9: Protein SfbI und dessen Derivate

Nach Vorversuchen zur Lokalisation der rekombinanten Proteine in der löslichen oder unlöslichen Fraktion mit geringen Volumina wurde für die Überexpression ein Liter LB-Medium, versetzt mit Ampicillin und PMSF, mit 5ml einer Ü/N-Kultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 inkubiert und die Expression der Proteine schließlich mit 2 mM IPTG induziert. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C und unter geringem Schütteln wurden die Bakterien pelletiert und zur Lyse in B-PER™ (Bacterial Protein Extraction Reagent) resuspendiert. Die Isolierung der His-Tag-Fusionsproteine erfolgte wie unter II 6.1 beschrieben. Die Kontrolle der einzelnen Fraktionen auf Reinheit erfolgte durch Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse (II 6.3.3, Abb.10).

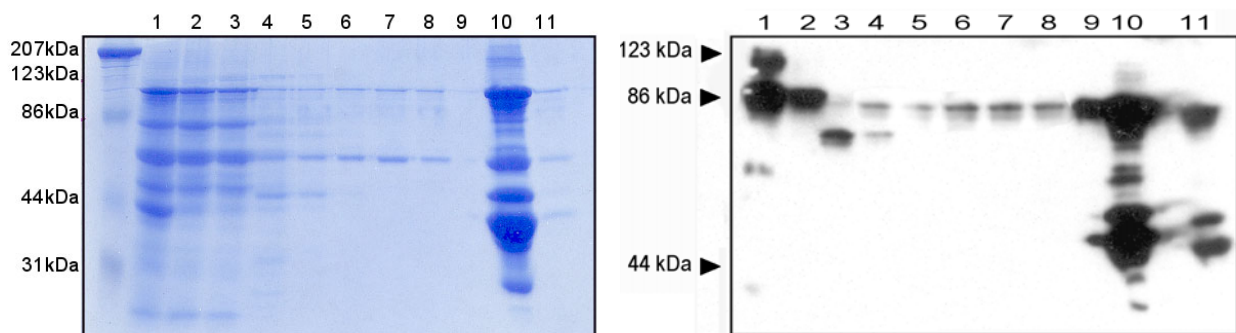


Abb.10: Kontrolle der aufgefundenen Fraktionen mittels Coomassie-Färbung (links) und Western-Blot Analyse (rechts) am Beispiel H2. Der verwendete Antikörper war spezifisch für Gesamt-SfBI. (Bahn 1: vor Aufreinigung, Bahn 2: Durchfluss, Bahn 3-5: Waschpuffer 1, Bahn 6-8: Waschpuffer 2, Bahn 9: frei, Bahn 10+11: Elution)

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteine in Gegenwart von 1mM PMSF bei 4°C gelagert. Da das Protein SfBI sehr leicht irreversibel präzipitiert ist eine Lagerung bei -20°C mit einem Glycerin-Anteil von 20% nur unter erheblichen Mengeneinbußen der Proteine möglich. Unter den gewählten Bedingungen ist jedoch eine Lagerung über Monate ohne große Einbußen möglich.

1.2 Charakterisierung der durch verschiedene Regionen des SfBI hervorgerufenen Immunantworten

Vor dem Einsatz der rekombinanten Proteine für Immunisierungsstudien wurden diese gegen PBS dialysiert und im Falle einer längeren Lagerung durch Western Blot Analyse erneut auf Degradation hin untersucht.

Die Verabreichung der aufgereinigten SfBI-Derivate an Mäusen erfolgte intranasal wie unter II 7.1.1 bzw. 7.1.2 beschrieben. Von jedem Derivat wurden pro Maus 510 pmol zusammen mit 180 pmol des mukosalen Adjuvans CTB (B-Untereinheit des Cholera-Toxins) gegeben.

1.2.1 Antigen-spezifische, humorale Immunantwort

Die Immunisierung resultierte in allen Fällen in einer effizienten, humoralen Immunantwort. Die höchsten Antikörper-Titer wurden in Mäusen detektiert, die mit H2 und H10 vakziniert wurden. In diesen Fällen lag bereits nach der zweiten Immunisierung ein erhöhter Titer vor, während die Immunisierung mit der Fibronektin-Bindungsdomäne, H12, erst nach der dritten

Immunisierung eine entsprechende Antwort lieferte (Abb.11). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die ausschließlich mit dem Adjuvans immunisiert wurde, bestand ein statistisch signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ (Student'schen t -Test).

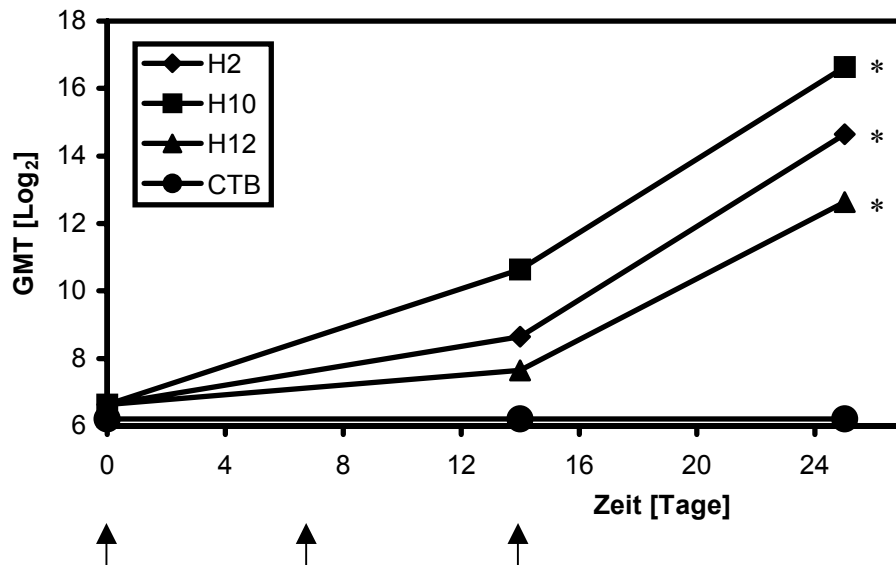


Abb.11: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch die SfbI-Derivate. Die Ergebnisse sind als reziproker Log_2 des geometrischen Mittelwertes des Endpunkttiters (GMT) von fünf Mäusen pro Gruppe dargestellt. Zwischen den einzelnen Gruppen und der Kontrollgruppe (CTB allein) besteht ein statistisch signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ (*, Student'schen t -Test). Die Immunisierungszeitpunkte sind durch Pfeile markiert.

Neben der Gesamtmenge an gebildetem IgG wurden außerdem die durch die verschiedenen Derivate stimulierten IgG-Isotypen-Muster bestimmt. Diese geben Aufschluss darüber, welche T-Helferzellen-Subpopulation bei der Immunantwort gegen das jeweilige Protein aktiv ist. T-Zellen bilden und sezernieren Cytokine, die den Wechsel zu unterschiedlichen IgG-Isotypen stimulieren. So wird bei der Maus von Th2-Helferzellen das Cytokin IL-4 gebildet, welches überwiegend den Wechsel zu IgG1 hervorruft, während das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ bevorzugt den Wechsel zu IgG2a und IgG3 induziert (Boom *et al.*, 1988; Stevens *et al.*, 1988).

Die von H2 und H12 überwiegend hervorgerufene IgG1-Antwort weist daher auf eine vermehrte Th2-Population hin, während die Immunisierung mit H10 gleiche Mengen an IgG1 und IgG2a hervorbringt (Abb.12) und somit gleichermaßen sowohl Th2- als auch Th1-Helferzellen stimuliert.

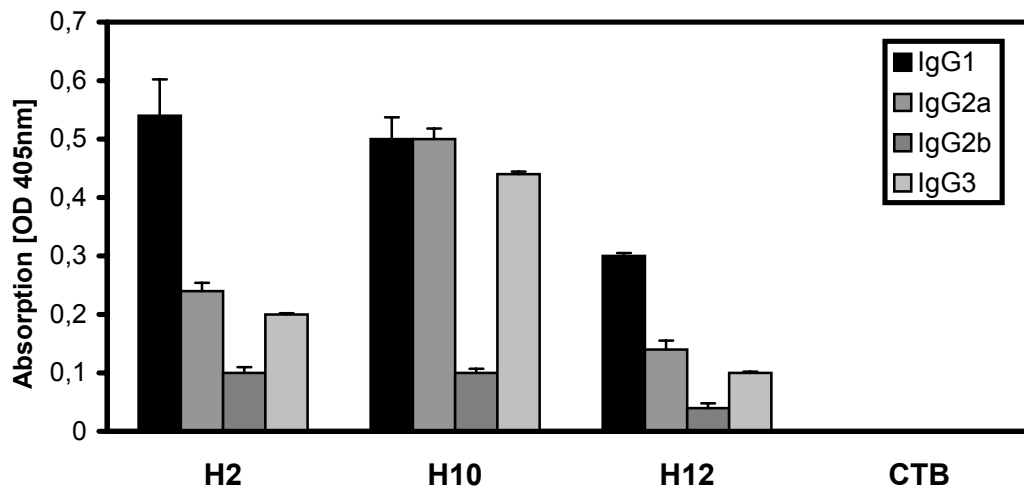


Abb.12: IgG-Isotypen-Muster der durch die SfbI-Derivate hervorgerufenen spezifischen, humoralen Immunantwort. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.2.2 Antigen-spezifische, mukosale Antikörperantwort

Die Bildung sekretorischer Antikörper spielt eine wesentliche Rolle bei der Abwehr vieler Pathogene. Wie bereits erwähnt, lassen vorangegangene Infektionsstudien darauf schließen, dass die Stimulierung sekretorischer IgA durch Immunisierung mit SfbI für einen Schutz vor *S. pyogenes*-Infektionen wichtig ist (Guzman, *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob und in welchem Maße die SfbI-Derivate in der Lage sind, ebenfalls die Bildung sekretorischer IgA in der Schleimhaut der Atemwege zu induzieren.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Fibronektin-Bindungsdomäne (H12) mit einem Anteil an antigenspezifischen IgA von etwa 25% an Gesamt-IgA in der Lunge am effizientesten eine entsprechende Immunantwort stimuliert (Abb.13).

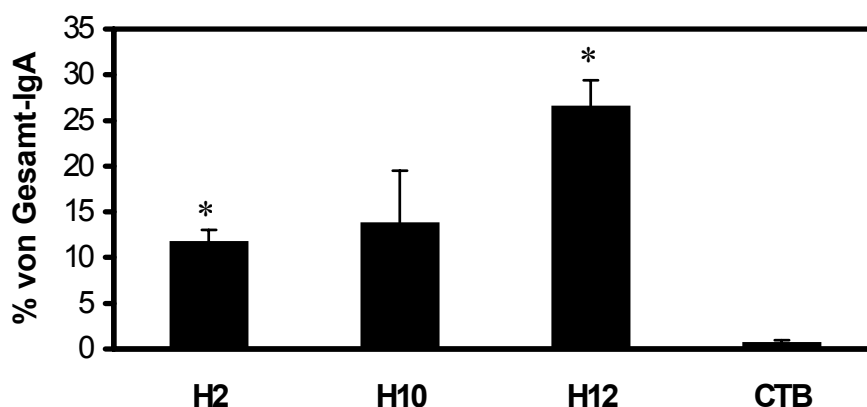


Abb.13: Antigen-spezifische IgA in Lungenwaschungen aus Mäusen. Der Anteil antigenspezifischer IgA an der Gesamtmenge sekretorischer IgA ist in Prozent dargestellt. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe mit $P < 0,05$ (*). Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.2.3 Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit SfbI-Derivaten

Neben der Charakterisierung der humoralen Immunantwort wurde außerdem die Bildung antigen-spezifischer Effektorzellen, durch die Proteine H2, H10 und H12 stimuliert, untersucht. Hierzu wurden 25 Tage nach Immunisierung der Mäuse die Zellen wie unter II 7.2.3 beschrieben aus der Milz und den peritrachealen Lymphknoten isoliert und für einen T-Zell-Proliferationsassay (II 7.3.1) eingesetzt.

Während die Zellen aus den mit H2 bzw. H12 geimpften Mäusen nach vier Tagen Inkubation in Gegenwart von 20 µg/ml des Impfantigens mit vergleichbaren, hohen Proliferationsraten reagierten, bestand zwischen den Zellen aus den mit H10 immunisierten Tieren und der Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied. Darüber hinaus zeigte sich, dass die lokale Immunantwort deutlich stärker ausgeprägt war als die systemische (Abb.14 A).

Wie bereits von Medina *et al.* (1998 und 2000) gezeigt wurde ist das Protein SfbI in der Lage, unspezifisch die Proliferation von B-Zellen durch Bindung an das F (ab')₂-Fragment oberflächengebundener IgG zu stimulieren. Aus diesem Grund wurde ein Proliferationsassay durchgeführt, der Aufschluss über die Natur der proliferierenden Zellen geben sollte. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Entfernung der B-Zellen eine signifikante Abnahme der Zellproliferation zur Folge hatte (Abb.14 B).

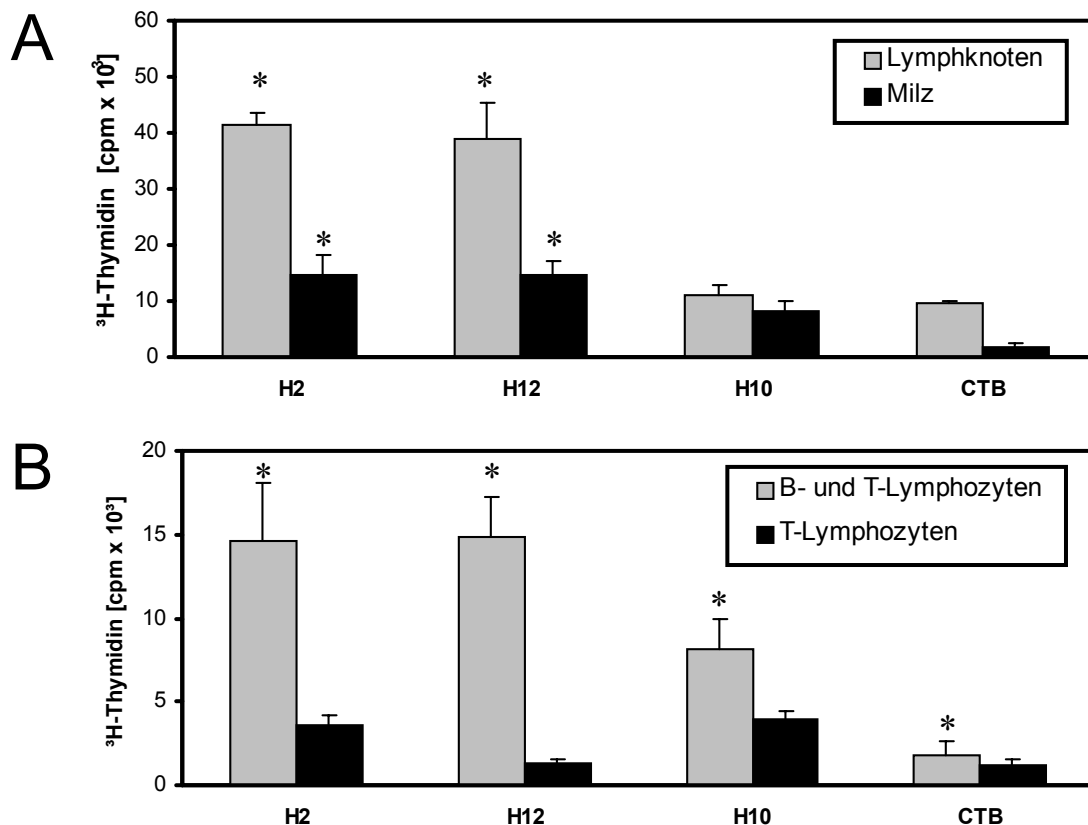


Abb.14: Zelluläre Immunantwort nach Immunisierung mit SfbI-Derivaten. (A) Antigen-spezifische Proliferation von Zellen aus Milz und Lymphknoten. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen H2 bzw. H12 und H10 sowie der Kontrollgruppe (CTB allein) mit $P < 0,05$ (*). (B) Effekt der Entfernung der B-Zellen auf die Proliferationsrate der Zellen aus der Milz. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proliferationsraten der gesamten Zellpopulationen und den entsprechenden Raten nach Entfernung der B-Zellen (*). Ferner besteht auch nach der Entfernung ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen H2 bzw. H10 und der Kontrollgruppe CTB. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.2.4 Analyse des durch verschiedene SfbI-Derivate nach intranasaler Immunisierung hervorgerufenen Impfschutzes

Um die Schutzwirkung der SfbI-Fragmente H2, H10 und H12 zu untersuchen wurden die Mäuse (BALB/c) wie unter II 7.1.2 beschrieben zusammen mit dem mukosalen Adjuvans CTB immunisiert. 10 Tage nach der letzten Immunisierung wurden sie schließlich mit dem virulenten *S. pyogenes* Stamm NS192, einem heterologen Blutisolat aus dem australischen *Northern Territory*, intranasal infiziert.

Während alle 10 Mäuse der Kontrollgruppe (CTB allein) innerhalb von fünf Tagen mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von etwa 2,4 Tagen gestorben sind, bietet eine Impfung mit der Fibronektin-Bindungsdomäne (H12) einen Schutz von 80% und eine Impfung mit H2 von 60%. Die Vakzinierung mit H10 hingegen bietet mit einer Sterblichkeitsrate von 90% und einer durchschnittlichen Überlebensdauer von ebenfalls nur etwa 2,4 Tagen keinen Schutz vor einer Streptokokkeninfektion (Abb.15).

Weiterhin hat sich gezeigt, dass eine Immunisierung mit dem Fragment H8, welches lediglich die Fibronektin-Bindungsrepeats umfasst, ebenso wie mit der gesamten Domäne (H12) einen Schutz von 80% erzielt (Abb.15).

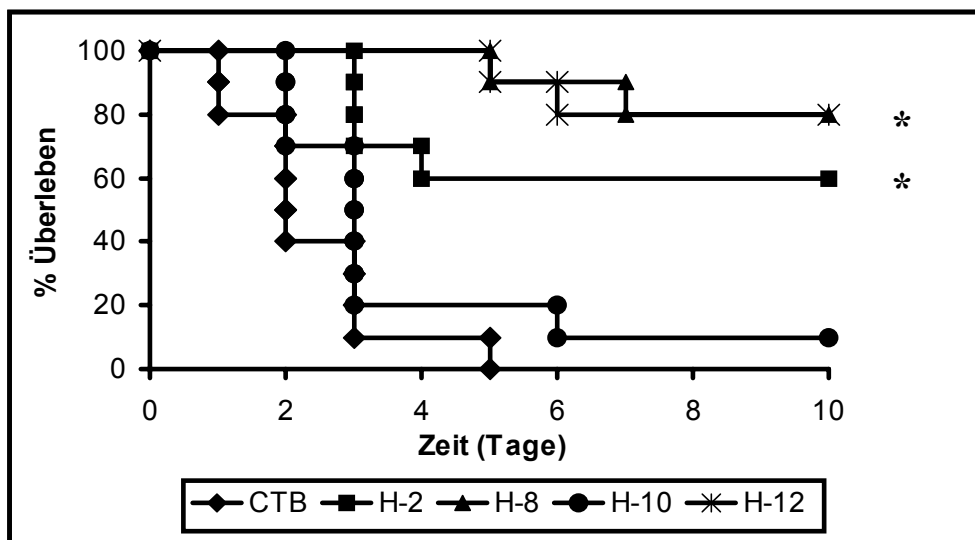


Abb.15: Impfschutz durch SfbI-Derivate nach intranasaler Immunisierung gegen eine Infektion mit einem heterologen *S. pyogenes* Stamm. 10 Mäuse pro Gruppe wurden nach der Impfung mit 10^8 KBE des Stammes NS192 intranasal infiziert. Die Sterbeziffer wurde täglich untersucht. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen H2, H8 bzw. H12 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$ (*). H2, H8 und H12 untereinander unterscheiden sich nicht signifikant.

Da sich in einem ELISA unter Verwendung von Seren aus Mäusen, die mit dem H2-Fragment immunisiert wurden nur Antikörper gegen die SfbI-Derivate H8, H10 und H12 nicht aber gegen den Fibronektin-Bindungsspacer (H4) detektieren ließen (Abb.16), lässt sich daraus schließen, dass ausschließlich die Fibronektin-Bindungsrepeats für den Impfschutz gegen eine Infektion mit *S. pyogenes* verantwortlich sind.

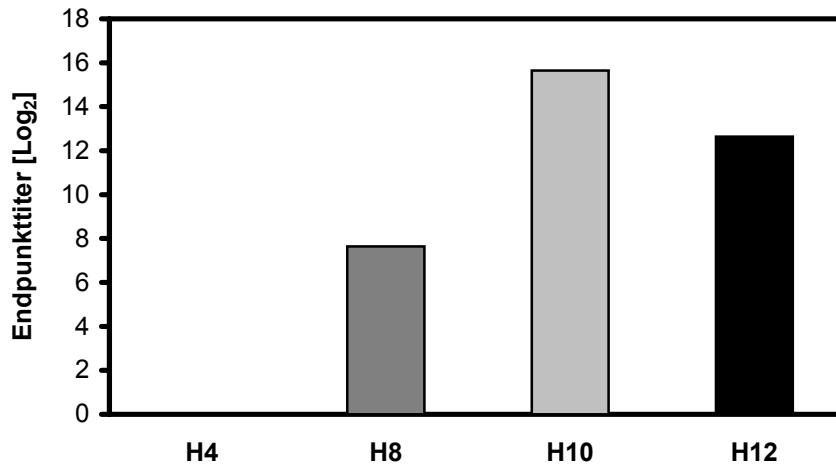


Abb.16: Antigen-spezifische IgG-Bildung nach Stimulation durch das SfbI-Derivat H2. Die Ergebnisse sind als reziproker Log₂ des Endpunkttiters dargestellt.

1.3 Ausbildung eines schützenden immunologischen Gedächtnisses nach intranasaler Immunisierung mit dem SfbI-Derivat H12

Nach der intranasalen Immunisierung der Mäuse mit 510 pmol H12 zusammen mit 180 pmol des mukosalen Adjuvans CTB (II 7.1.1) wurden die Tiere zur Charakterisierung eines potentiellen, immunologischen Gedächtnisses für ca. drei Monate belassen und danach prozessiert.

1.3.1 Antigen-spezifischer Antikörpertiter im Serum drei Monate nach intranasaler Immunisierung

Die Immunisierung von Mäusen mit der Fibronectin-Bindungsdomäne (H12) stimulierte einen hohen Titer antigen-spezifischer IgG. Etwa 90 Tage nach Gabe der dritten Immunisierung wurde noch ca. ein Dreißigstel der Ausgangsmenge im Serum detektiert (Abb.17). Dies entsprach bei einer Halbwertszeit der IgG von etwa 25 Tagen nahezu der zu erwartenden Menge.

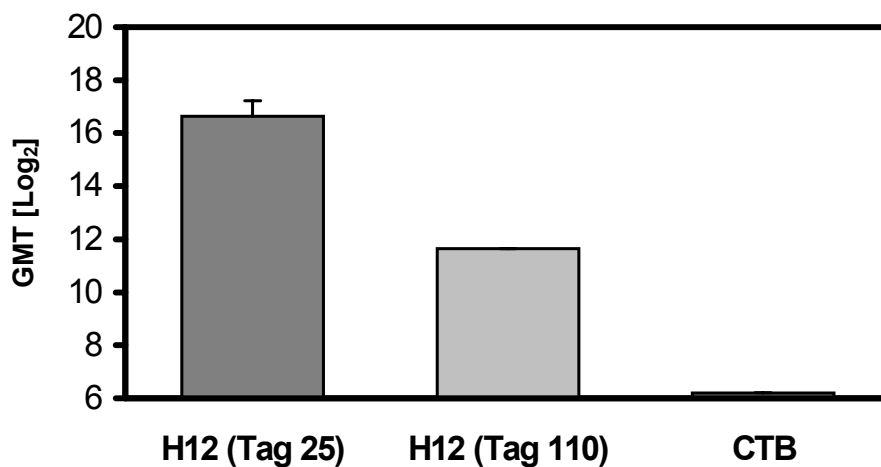


Abb.17: Antigen-spezifische IgG ca. drei Wochen bzw. dreieinhalb Monate nach Stimulation durch das SfbI-Derivat H12. Die Ergebnisse sind als reziproker Log₂ des geometrischen Mittelwertes des Endpunkttiters (GMT) von fünf Mäusen pro Gruppe dargestellt. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt

Um einen Hinweis auf den Charakter der T-Helferzellen-Subpopulation zu erhalten, wurde außerdem das durch die Fibronektin-Bindungsdomäne stimulierte IgG-Isotypen-Muster bestimmt. Auch drei Monate nach Immunisierung mit H12 hat sich die Verteilung der IgG-Isotypen nicht geändert. Es bestand weiterhin ein erhöhter IgG1-Titer und damit vorrangig eine Th2-Zellpopulation (Abb.18).

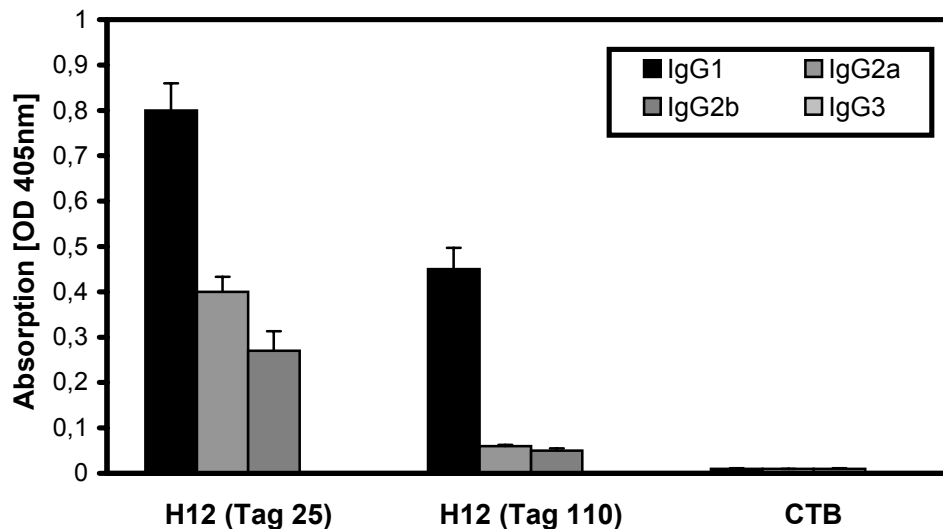


Abb.18: IgG-Isotypen-Muster der durch das SfbI-Derivat H12 hervorgerufenen Antikörper drei Monate nach der Immunisierung. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.3.2 Antigen-spezifischer, mukosaler IgA-Titer drei Monate nach intranasaler Immunisierung

Da die Generierung sekretorischer IgA für die Abwehr von Streptokokkeninfektionen essentiell zu sein scheint wurde untersucht, wie groß der Anteil antigen-spezifischer IgA in der Lunge der Mäuse noch nach drei Monaten ist. Dazu wurden wie unter II 7.2.4 Lungenwaschungen und zur Detektion der spezifischen Antikörper ELISA durchgeführt. Wie aus Abbildung 19 zu entnehmen ist, hat die Menge an spezifischen IgA gegen H12 aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit deutlich abgenommen. Ein effektiver Schutz vor einer Streptokokkeninfektion ohne die Gegenwart von B-Gedächtniszellen dürfte nicht mehr gewährleistet sein. Zur Verifikation wurden daher Infektionsstudien durchgeführt (1.3.4).

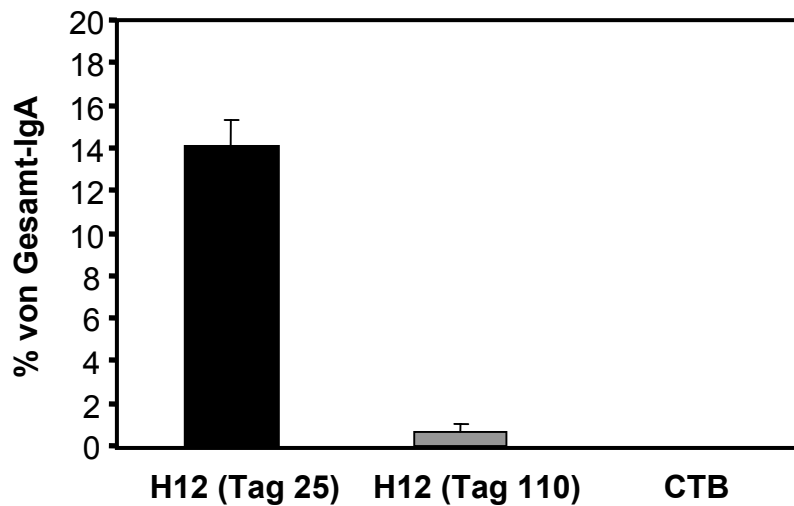


Abb.19: Spezifische IgA für die fibronectinbindende Domäne H12 in Lungenwaschungen aus Mäusen drei Wochen bzw. drei Monate nach intranasaler Immunisierung. Der Anteil antigenspezifischer IgA an der Gesamtmenge sekretorischer IgA ist in Prozent dargestellt. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.3.3 Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort drei Monate nach intranasaler Immunisierung mit dem SfbI-Derivat H12

Neben den B-Gedächtniszellen werden während der primären Immunantwort auch T-Gedächtniszellen gebildet. Diese langlebigen Zellen zirkulieren im Organismus und sind wie die B-Gedächtniszellen dafür verantwortlich, dass bei erneutem Kontakt mit einem Antigen die sekundäre Immunantwort deutlich schneller und stärker stattfindet. Die Analyse der zellulären Immunantwort 110 Tage (Abb.20 B) nach Vakzinierung mit der fibronectinbindenden Domäne (H12) zur Detektion potentieller T-Gedächtniszellen hat keinen statistisch signifikanten Unterschied zu der Proliferationsrate der Kontrolle (25 Tage) gezeigt (Abb.20 A). Da aktivierte T-Lymphocyten relativ kurzlebig sind kann daraus gefolgert werden, dass es sich bei den Zellen, die aufgrund der Restimulation mit dem Antigen proliferiert haben, um langlebige T-Zellen handelt.

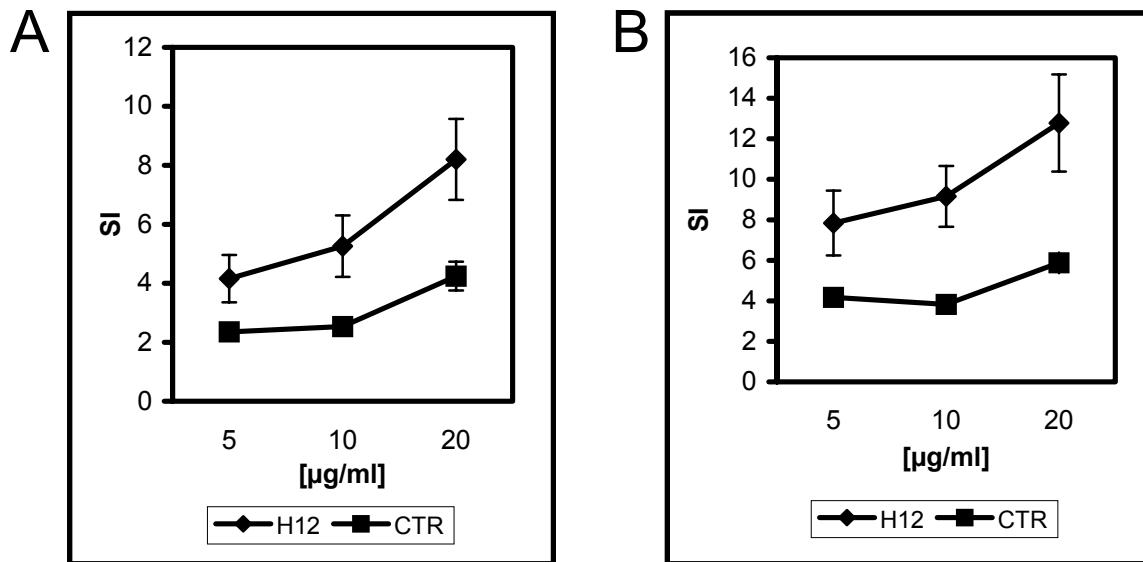


Abb.20: Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort. Zwischen den Proliferationsraten 25 (A) und 110 Tage (B) nach Vakzinierung besteht kein statistisch signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$. Die Proliferationsrate wurde nach drei Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens H12 durch Messung inkorporierten ^3H -Thymidins ermittelt. Der Stimulationsindex (SI) ergibt sich aus der Division der Proliferationsraten in Gegenwart des Antigens durch die in Abwesenheit des Antigens. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.3.4 Analyse der Effizienz des immunologischen Gedächtnisses nach intranasaler Immunisierung mit der Fibronektin-Bindungsdomäne

Im Anschluss an die Charakterisierung des Umfangs des gebildeten immunologischen Gedächtnisses wurden wiederum Infektionsstudien durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10 Mäuse pro Gruppe wie unter II 7.1.2 beschrieben immunisiert und nach drei Monaten schließlich mit dem *S. pyogenes* Stamm NS192 intranasal infiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch drei Monate nach Impfung der Tiere noch ein Impfschutz von 80%, im Vergleich zu 80% unmittelbar nach der Impfung bestand (Abb.21).

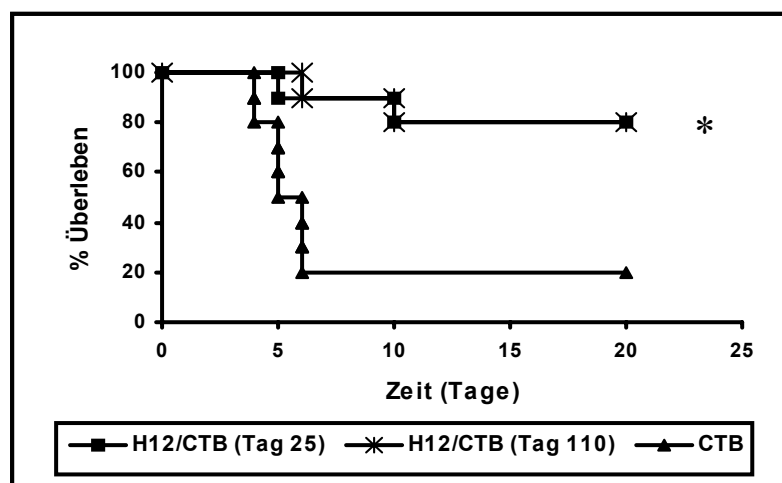


Abb.21: Impfschutz durch das SfbI-Derivat H12 25 und 110 Tage nach intranasaler Immunisierung. 10 Mäuse pro Gruppe wurden nach der Impfung mit 10^8 KBE des heterologen *S. pyogenes* Stammes NS192 intranasal infiziert. Die Sterbeziffer wurde täglich untersucht. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied, ob die Mäuse an Tag 25 oder 110 nach der Immunisierung (H12 koadministriert mit CTB) infiziert werden. Dagegen unterscheiden sich diese Gruppen von der Kontrollgruppe (CTB allein) statistisch signifikant ($P < 0,05$; *).

1.4 Antigen-spezifische Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit dem SfbI-Derivat H12 ohne Koadministration des mukosalen Adjuvans

Die Gabe löslicher Protein-Antigene über die nasale oder intestinale Schleimhaut resultiert gewöhnlich in einer schwachen Immunantwort oder in Abhängigkeit des Immunisierungsprotokolls auch zu einer systemischen Toleranz gegenüber dem Antigen. Die Ursache dafür liegt entweder in einer fehlenden Reaktionsfähigkeit von T-Zellen gegenüber dem Antigen oder in der Induktion antigenspezifischer T-Zellen, die suppressive Cytokine wie TGF- β_1 und IL-10 sekretieren (Strober, W., *et al.*, 1998; Weiner, H.L., 1997). Die Verabreichung eines Antigens zusammen mit einem Adjuvans führt zu einer deutlichen Verstärkung der antigenspezifischen Immunantwort. Jedoch stehen bisher nur eine sehr begrenzte Zahl solcher Adjuvantien zur Verfügung. CT wird im Tiermodell als mukosales Adjuvans eingesetzt. Für den intranasalen Einsatz beim Menschen ist es aufgrund seiner potentiellen Toxizität und Nebenwirkungen aber ungeeignet. Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass auch SfbI als mukosales Adjuvans wirken kann (Medina *et al.*, 1998). Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob die Koadministration von CTB für die Stimulation einer schützenden Immunantwort gegen *S. pyogenes* durch SfbI essentiell ist.

1.4.1 Antigen-spezifische, humorale Immunantwort

Für die Analyse der Immunantwort ohne mukosalem Adjuvans wurden die Mäuse wie unter II 7.1.2 beschrieben mit dem rekombinanten Protein H12 immunisiert. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass auch ohne Koadministration mit CTB hohe IgG-Titer gegen die Fibronektin-Bindungsdomäne gebildet wurden (Abb.22).

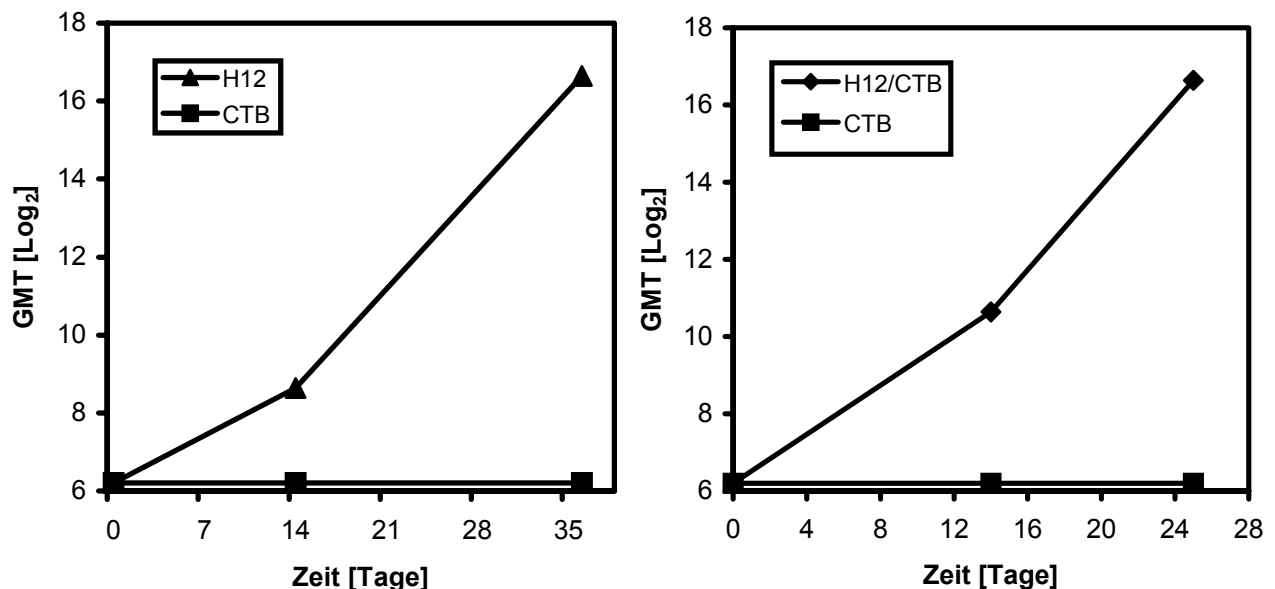


Abb.22: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch das SfbI-Derivat H12 ohne gleichzeitiger Gabe des Adjuvans CTB. Die Ergebnisse sind als reziproker Log₂ des Endpunkttiters (GMT) dargestellt.

Des weiteren wurde neben der Menge der gebildeten, antigenspezifischen IgG untersucht, welchen Einfluss CTB auf die stimulierte T-Helferzellen-Subpopulation ausgeübt hat. Dazu wurde die Verteilung der IgG-Isotypen analysiert. Wie aus Abbildung 23 deutlich wird, hatte

das Fehlen des Adjuvans keine Auswirkung auf die durch H12 stimulierte T-Zell-Subpopulation. Es ist demnach davon auszugehen, dass CTB und H12 gleichermaßen T-Helferzellen stimulieren. Es wurde wie bei Koadministration mit CTB überwiegend eine IgG1-Antwort einhergehend mit einer vermehrten Th2-Population hervorgerufen (Abb.23).

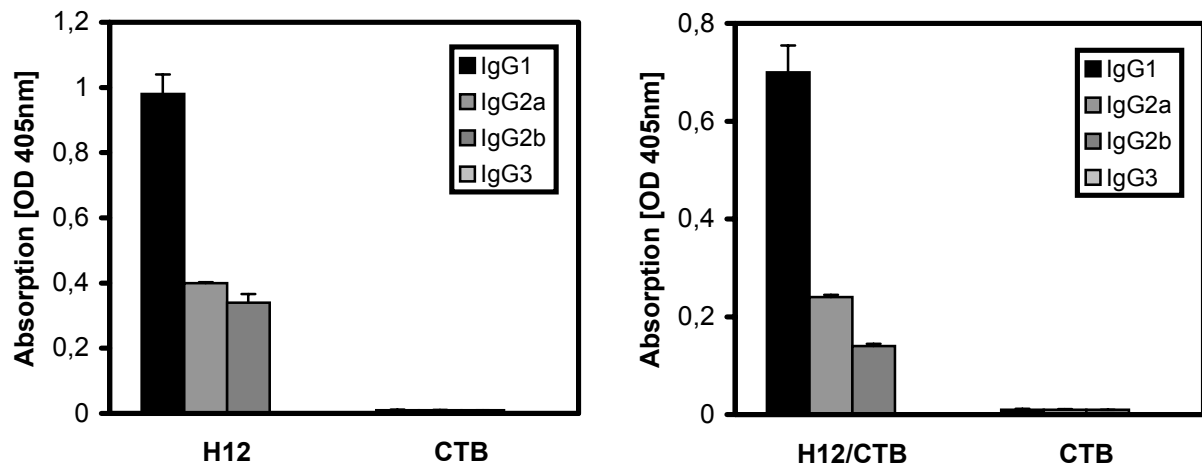


Abb.23: IgG-Isotypen-Muster der durch das SfbI-Derivat H12 hervorgerufenen spezifischen, humoralen Immunantwort ohne (links) und mit mukosalem Adjuvans CTB (rechts). Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.4.2 Antigen-spezifische, mukosale Antikörperantwort

CTB als mukosales Adjuvans stimuliert auf klonaler Ebene in B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgA, so dass die Menge IgA produzierender Zellen zu nimmt, nicht etwa die Menge der von B-Zellen sekretierten IgA (Pyeong-Hyeun, K. *et al.* 1998). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Fibronectin-Bindungsdomäne (H12) auch ohne CTB in der Lage ist, die Bildung sekretorischer IgA zu stimulieren. Die in den Lungenwaschungen enthaltenen IgA-Titer unterschieden sich nicht von denen aus solchen Mäusen, die mit H12 und CTB immunisiert wurden (Abb.24).

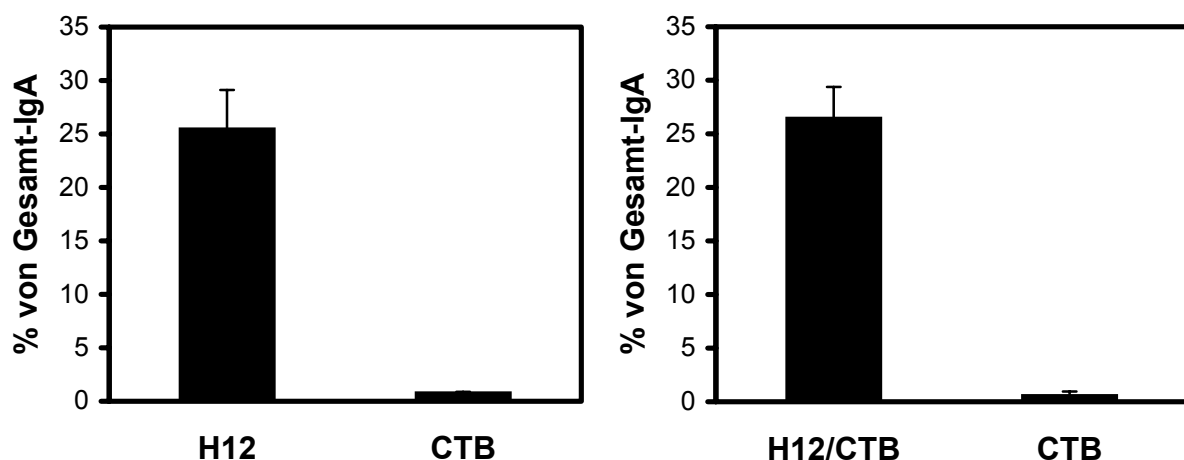


Abb.24: Antigen-spezifische IgA in Lungenwaschungen aus Mäusen, die mit der Fibronectin-Bindungsdomäne (H12) allein (links) oder zusammen mit CTB (rechts) immunisiert wurden. Der Anteil antigen-spezifischer IgA an der Gesamtmenge sekretorischer IgA ist in Prozent dargestellt. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.4.3 Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort

Während das Holotoxin von *V. cholerae* in der Lage ist, T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu verstärken, wird die T-Zellproliferation von der B-Untereinheit des Choleratoxins unterdrückt (Braun, M.C. *et al.*, 1999; Elson, C.O. *et al.*, 1995; Munoz, E. *et al.*, 1990; Woogen, S.D. *et al.*, 1987 und 1993). Die Vakzinierung von Mäusen ohne CTB als Adjuvans könnte daher Auswirkungen auf die zelluläre Immunantwort gegen das Antigen H12 haben. Deswegen wurde ebenfalls die zelluläre Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit H12 in Abwesenheit von CTB genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es auch ohne mukosalem Adjuvans zur Stimulierung einer spezifischen, zellulären Immunantwort kommt, welche sich nicht von solcher unterscheidet, die mit mukosalem Adjuvans (CTB) hervorgerufen wird (Abb.25).

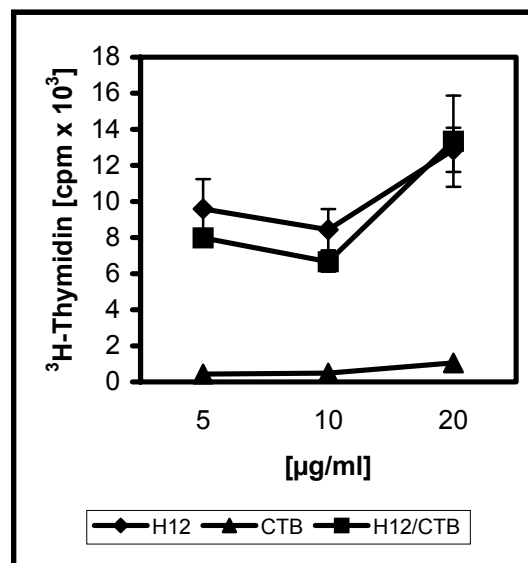


Abb.25: Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit und ohne dem mukosalen Adjuvans CTB. Zwischen den beiden stimulierten Immunantworten besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0,05$). Die Proliferationsrate wurde nach drei Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens H12 durch Messung inkorporierten ³H-Thymidins ermittelt. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

1.4.4 Analyse des durch das SfbI-Derivat H12 hervorgerufenen Impfschutzes ohne Koadministration des Adjuvans CTB

Es hat sich gezeigt, dass die Immunisierung mit H12 ohne das Adjuvans CTB effektiv vor einer Streptokokkeninfektion schützt (Abb.26). So führte die intranasale Immunisierung ohne CTB zu einem Impfschutz von 70% im Vergleich zu 80% der Kontrollgruppe (H12 koadministriert mit CTB). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch etwa drei Monate nach der Immunisierung ohne Adjuvans noch ein Impfschutz von 80% besteht, d.h. ein immunologisches Gedächtnis stimuliert wurde. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den geimpften Gruppen ($P < 0,05$).

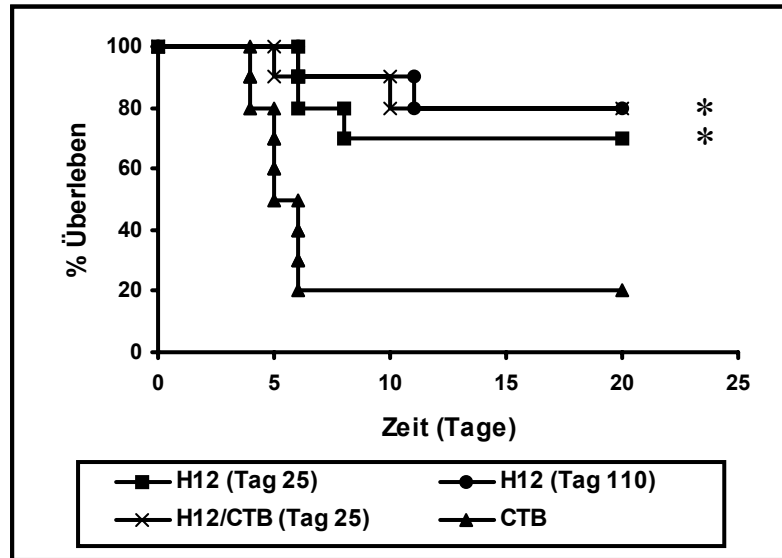


Abb.26: Impfschutz durch das SfbI-Derivat H12 25 bzw. 110 Tage nach intranasaler Immunisierung ohne mukosalem Adjuvans CTB. 10 Mäuse pro Gruppe wurden nach der Impfung mit 10^8 KBE des heterologen *S. pyogenes* Stammes NS192 intranasal infiziert. Die Sterbeziffer wurde täglich untersucht. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit H12 geimpften Gruppen und der mit CTB immunisierten Kontrollgruppe ($P < 0,05$; *). Zwischen der Kontrollgruppe H12 koadministriert mit CTB und den Gruppen ohne CTB besteht kein signifikanter Unterschied.

2. Epitop-Mapping innerhalb der Fibronectin-Bindungsdomäne

Für die Effizienz eines Impfstoffes ist es wichtig, dass er universal einsetzbar ist. Das heißt, es sollte nicht nur in einer, sondern in möglichst allen Bevölkerungsgruppen ein Impfschutz erzielt werden. Für Impfstoffe, die auf kurzen Peptiden basieren bedeutet das, dass ein Antigen z.B. wenigstens ein B-Zellepitop enthalten sollte, welches universell erkannt wird. Nachdem der Bereich für die Fibronectin-Bindung des Proteins SfbI eine große Rolle bei der Abwehr einer Streptokokkeninfektion spielt und außerdem hoch konserviert ist, wurde zur Identifizierung von Antigen determinanten und T-Zellepitopen ein Epitop-Mapping der Fibronectin-Bindungsrepeats durchgeführt. Hierzu wurde zum einen die 74 Aminosäuren umfassende Sequenz der ersten zwei fibronectinbindenden *Repeats* verwendet, um 15 (14 16-mere und ein 18-mer) aufeinander folgende, sich jeweils um 12 Aminosäuren überlappende Peptide zu synthetisieren, mit deren Hilfe sowohl lineare B- als auch T-Zellepitope bestimmt werden sollten (Tab.13, Abb.31). In Folge der *Repeats* waren die Peptide 1 und 10, 2 und 11, 3 und 12, 4 und 13 und 5 und 14 jeweils nur um eine Aminosäure und die Peptide 1 und 11, 2 und 12, 3 und 13, 4 und 14 und 5 und 15 nur um drei Aminosäuren verschoben.

Tab.13: Peptide zur Identifizierung der B- und T-Zellepitope innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI

| | Lokalisation | Peptidsequenz | | Lokalisation | Peptidsequenz |
|---|--------------|------------------|----|--------------|--------------------|
| 1 | 373-388 | VETEDTKEPGVLMGGQ | 9 | 405-420 | QTTPQVETEDTKEPGV |
| 2 | 377-392 | DTKEPGVLMGGQSESV | 10 | 409-424 | QVETEDTKEPGVLMGG |
| 3 | 381-396 | PGVLMGGQSESVFTK | 11 | 413-428 | EDTKEPGVLMGGQSES |
| 4 | 385-400 | MGGQSESVFTKDTQT | 12 | 417-432 | EPGVLMGGQSESVFT |
| 5 | 389-404 | SESVFTKDTQTGMSG | 13 | 421-436 | LMGGQSESVFTKDTQ |
| 6 | 393-408 | EFTKDTQTGMSGQTTP | 14 | 425-440 | QSESVFTKDTQTGMS |
| 7 | 397-412 | DTQTGMSGQTTPQVET | 15 | 429-446 | VEFTKDTQTGMSGQTASQ |
| 8 | 401-416 | GMSGQTTPQVETEDTK | | | |

Zum anderen wurde zur genaueren Bestimmung der linearen B-Zellepitope die Sequenz aller vier *Repeats* mit den angrenzenden Bereichen von Position 373 bis 528 verwendet, um 52 sich überlappende Peptide zu synthetisieren (Tab.14, Abb.32), die während der Synthese direkt an eine Membran gekoppelt (Frank, R., 1992) werden. Die membrangebundenen Peptide bestanden aus 15 Aminosäuren, besaßen keine Modifizierung und überlappten sich ebenfalls um jeweils 12 Aminosäuren. Aufgrund der nahezu identischen *Repeats* konnte außerdem eine Abfolge von Peptiden analysiert werden, deren Sequenz lediglich um eine Aminosäure verschoben war (Abb.29 C und 30 C).

Tab.14: Sequenzen der membrangebundenen Peptide zur Identifizierung der B-Zellepitope innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI mittels des Antikörperbindungstests (II 7.3.8)

| | Lokalisation | Peptidsequenz | | Lokalisation | Peptidsequenz |
|----|--------------|-----------------|----|--------------|-----------------|
| 1 | 361-375 | KLPNETGFSGNMVET | 27 | 439-453 | MSGQTASQVETEDTK |
| 2 | 364-378 | NETGFSGNMVETEDT | 28 | 442-456 | QTASQVETEDTKEPG |
| 3 | 367-381 | GFSGNMVETEDTKEP | 29 | 445-459 | SQVETEDTKEPGVLM |
| 4 | 370-384 | GNMVETEDTKEPGVL | 30 | 448-462 | ETEDTKEPGVLMGGQ |
| 5 | 373-387 | VETEDTKEPGVLMGG | 31 | 451-465 | DTKEPGVLMGGQSES |
| 6 | 376-390 | EDTKEPGVLMGGQSE | 32 | 454-468 | EPGVLMGGQSESVFT |
| 7 | 379-393 | KEPGVLMGGQSESV | 33 | 457-471 | VLMGGQSESVFTKD |
| 8 | 382-396 | GVLMMGGQSESVFTK | 34 | 460-474 | GGQSESVFTKDTQT |
| 9 | 385-399 | MGGQSESVFTKDTQ | 35 | 463-477 | SESVFTKDTQTGMS |
| 10 | 388-402 | QSESVFTKDTQTGM | 36 | 466-480 | VEFTKDTQTGMSGQT |
| 11 | 391-405 | SVEFTKDTQTGMSGQ | 37 | 469-483 | TKDTQTGMSGQTTPQ |
| 12 | 394-408 | FTKDTQTGMSGQTTP | 38 | 472-486 | TQTGMSGQTTPQVET |
| 13 | 397-411 | DTQTGMSGQTTPQVE | 39 | 475-489 | GMSGQTTPQVETEDT |
| 14 | 400-414 | TGMSGQTTPQVETED | 40 | 478-492 | GQTTPQVETEDTKEP |
| 15 | 403-417 | SGQTTPQVETEDTKE | 41 | 481-495 | TPQVETEDTKEPGVL |
| 16 | 406-420 | TTPQVETEDTKEPGV | 42 | 484-498 | VETEDTKEPGVLMGG |
| 17 | 409-423 | QVETEDTKEPGVLMG | 43 | 487-501 | EDTKEPGVLMGGQSE |
| 18 | 412-426 | TEDTKEPGVLMGGQS | 44 | 490-504 | KEPGVLMGGQSESV |

| | Lokalisation | Peptidsequenz | | Lokalisation | Peptidsequenz |
|----|--------------|-----------------|----|--------------|-----------------|
| 19 | 415-429 | TKEPGVLMGGQSESV | 45 | 493-507 | GVLMGGQSESVFTK |
| 20 | 418-432 | PGVLMGGQSESVFT | 46 | 496-510 | MGGQSESVFTKDTQ |
| 21 | 421-435 | LMGGQSESVFTKDT | 47 | 499-513 | QSESVFTKDTQTGM |
| 22 | 424-438 | GQSESVFTKDTQTG | 48 | 502-516 | SVEFTKDTQTGMSGF |
| 23 | 427-441 | ESVEFTKDTQTGMSG | 49 | 505-519 | FTKDTQTGMSGFSET |
| 24 | 430-444 | EFTKDTQTGMSGQTA | 50 | 508-522 | DTQTGMSGFSETVTI |
| 25 | 433-447 | KDTQTGMSGQTASQV | 51 | 511-525 | TGMSGFSETVTIVED |
| 26 | 436-450 | QTGMSGQTASQVETE | 52 | 514-528 | SGFSETVTIVEDTRP |

2.1 Charakterisierung linearer B-Zell-Epitope

Zunächst wurde untersucht, in wie weit sich die in dem Inzucht-Mausstamm BALB/c durch Immunisierung mit der fibronectinbindenden Domäne (H12) hervorgerufene, humorale Immunantwort von der in den congenen Mausstämmen BALB/b und BALB/k unterscheidet. Diese Mäuse besitzen zusammen mit BALB/c bis auf einen einzigen Locus ein identisches Genom. Sie unterscheiden sich lediglich in den MHCs (Haupthistokompatibilitätskomplex). Es wurden jeweils 5 Mäuse pro Stamm mit H12 immunisiert (II 7.1.1). Es folgte die Blutabnahme 10 Tage nach der dritten Immunisierung und schließlich die Bestimmung des IgG-Subklassenmusters (II 7.3.5). Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass das durch H12 stimulierte IgG-Isotypenprofil mit einer prädominanten IgG1-Antwort für alle drei Haplotypen gleich ist (Abb.27).

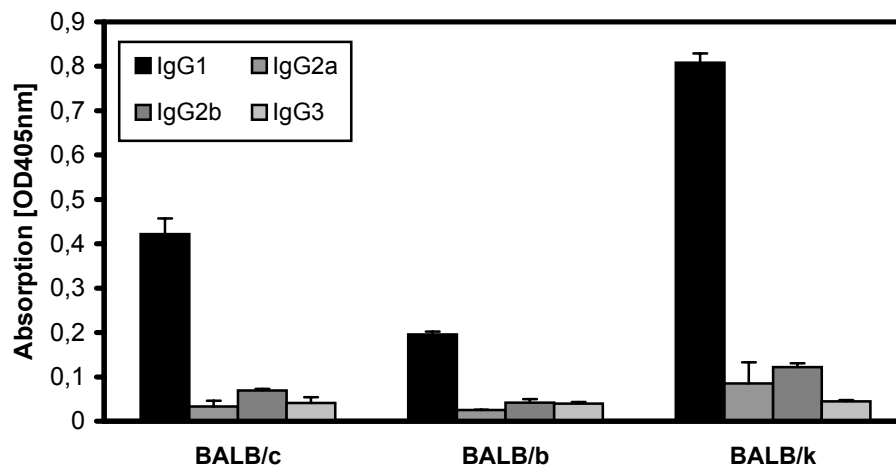


Abb.27: IgG-Isotypen-Muster der durch die Fibronectin-Bindungsdomäne H12 hervorgerufenen spezifischen Immunantwort in den congenen Mausstämmen BALB/c, BALB/b und BALB/k. Als Antigen diente H12. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Die Standardabweichung ist durch vertikale Linien angezeigt.

Die durch die Fibronectin-Bindungsdomäne in den congenen Mäusen hervorgerufene Immunantwort machen das Potential dieser Domäne für die Entwicklung eines Impfstoffes deutlich. In weiterführenden Untersuchungen sollten daher die B- und T-Zellepitope innerhalb dieser Region identifiziert werden. In BALB/c lassen sich ausgehend von dem Ergebnis des ELISA (Abb.28) etwa zwei Bereiche für die Antigenbindung detektieren. Die Absorptionsmaxima der Peptide 2, 3 und 4 zeigten keinen statistisch signifikanten

Unterschied ($P < 0,05$), wohl aber die der Peptide 4 und 1 und 4 und 5. Es ist daher zu vermuten, dass ein Bereich zwischen Position 385 und 392 (MGGQSESV) lokalisiert ist. Diese Sequenz existiert ein zweites Mal zwischen Position 422 und 429, so dass für die Peptide 11 bis 13 etwa gleiche Absorptionsmaxima zu erwarten gewesen wären. Während sich die Peptide 12 und 13 und 2-4 nicht signifikant unterschieden, wies Peptid 11 hingegen eine statistisch signifikant geringere Antikörperbindung auf ($P < 0,05$). Ferner hat Peptid 14 ebenfalls signifikant weniger Antikörper gebunden als Peptid 12, so dass letztlich ein lineares B-Zellepitop zwischen Position 385 und 396 (MGGQSESVFTK) zu vermuten ist.

Der zweite Bereich eines potentiellen Epitops scheint sich zwischen Position 401 und 412 (GMSGQTPQVET) zu befinden. Dies lässt sich daraus folgern, dass sich die Absorptionsmaxima der Peptide 7 und 8 untereinander nicht signifikant unterschieden, wohl aber von denen der Peptide 6, 9 und 10.

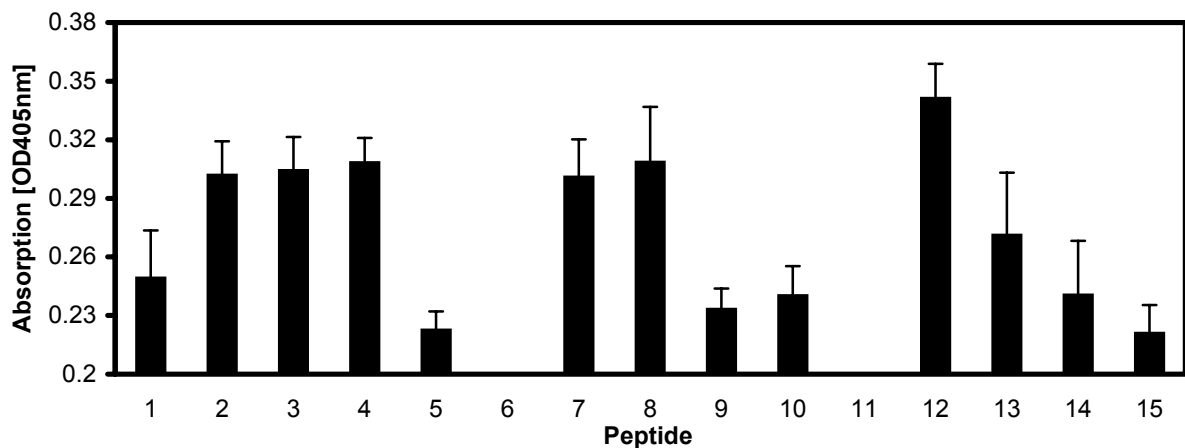


Abb.28: Identifizierung von B-Zellepitopen innerhalb der Fibronektin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI mittels ELISA. Die Auswertung erfolgte photometrisch, der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

Die Bestimmung der linearen B-Zellepitope der congenen Mausstämme BALB/b und BALB/k erbrachte im Gegensatz zu BALB/c lediglich ein Epitop.

Wie aus Abb.29 A-C bzw. 30 A-C deutlich wird sind sich die B-Zellepitope der beiden Stämme BALB/b und BALB/k sehr ähnlich. Vergleicht man die ELISA-Ergebnisse (Abb.29 A und 30 A) miteinander, so lieferte die Aminosäuresequenz zwischen Position 373 und 392 in beiden Fällen das stärkste Signal. Während allerdings bei dem Mausstamm BALB/b eine Verschiebung der Sequenz um eine Aminosäure nach links noch keine Auswirkung zeigte, war die spezifische Antikörperbindung bei dem Stamm BALB/k statistisch signifikant vermindert (Peptide 1 und 10, $P < 0,05$). Eine Verschiebung der Sequenz um drei oder vier AMS nach rechts hatte wiederum lediglich bei BALB/k eine Reduktion der spezifischen Antikörperbindung zur Folge (Abb.29 C und 30 C).

Mittels des Antikörperbindungstests wurde darüber hinaus versucht, die relevante Aminosäuresequenz noch genauer einzugrenzen. Für BALB/b konnte der Bereich für das potentielle Epitop auf diese Art auf die Aminosäuresequenz EDTKEPGVLMGG eingegrenzt werden. Es hatte sich gezeigt, dass sich die Antikörperbindungsraten der Peptide 29, 17, 5/42, 30, 18 und 6/43, welche die Sequenz enthielten, statistisch nicht signifikant unterschieden,

während die Bindung an Peptid 16 dagegen signifikant geringer war (Abb.29 C; $P < 0,05$). Ferner führte bereits der Verlust der Glutaminsäure an Position 376 dazu, dass praktisch keine Antikörperbindung mehr stattfand.

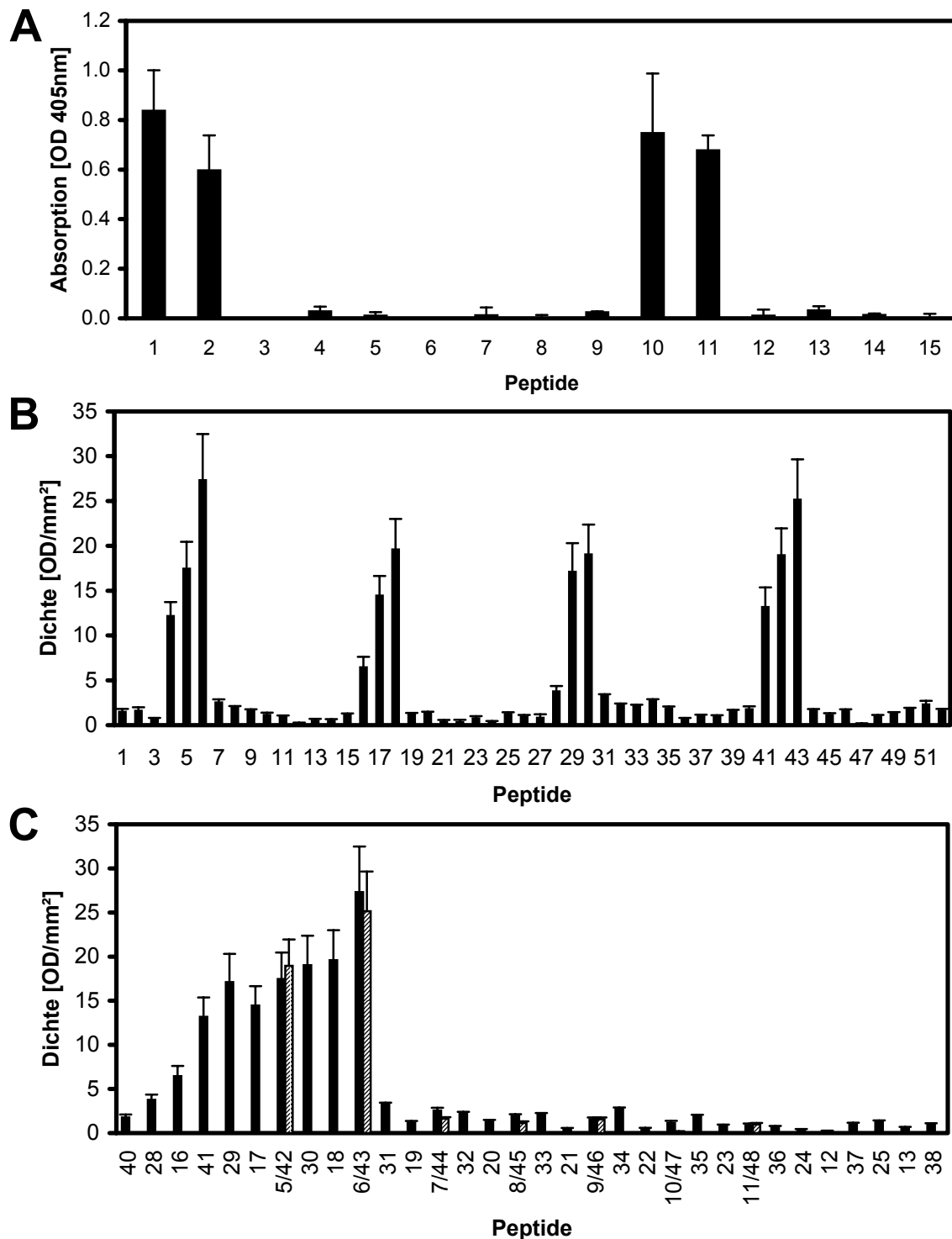
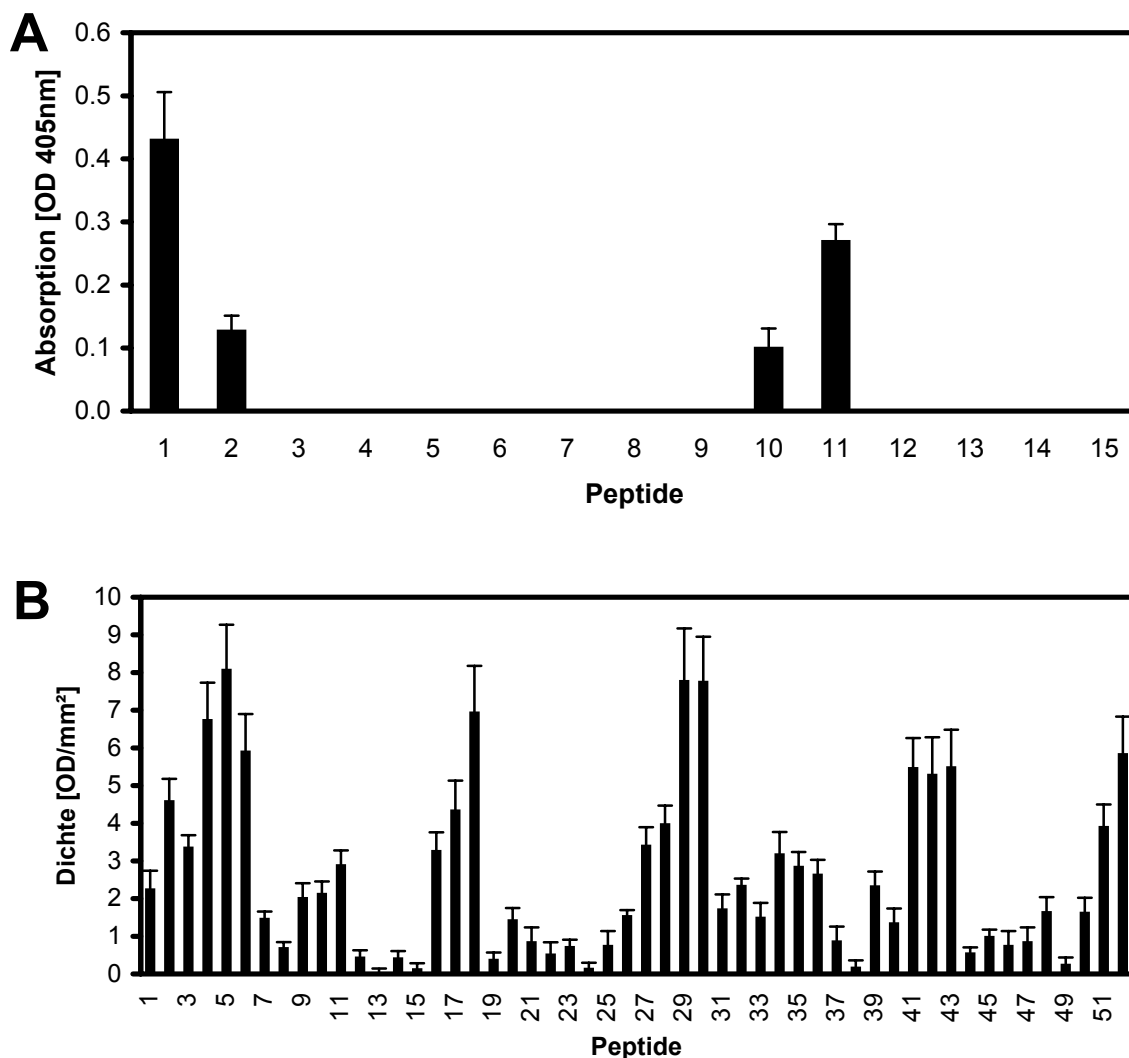


Abb.29: Identifizierung von B-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI bei dem congenen Mausstamm BALB/b mittels ELISA (A) und Antigenbindungstest (B+C). Die Auswertung erfolgte photometrisch (A) bzw. densitometrisch (B+C). Die in B dargestellte Peptidreihenfolge entspricht der Anordnung auf der Membran, d.h. aufeinander folgende Peptide sind um drei Aminosäuren versetzt, während in C solche Peptide aufeinander folgen, die nur um eine Aminosäure verschoben sind. Identische Peptide in C sind durch schraffierte Säulen dargestellt. Die Standardabweichung ist durch vertikale Linien angezeigt.

Bei dem congenen Mausstamm BALB/k hat der Antikörperbindungstest zu einem ähnlichen Ergebnis geführt. Auch hier scheint die Aminosäuresequenz EDTKEPGVLMGG für die spezifische Bindung essentiell zu sein. So nimmt die Antikörperbindungsrate von Peptid 16, welchem C-terminal das Leucin fehlt, gegenüber den Peptiden 41, 29, 5/42, 30, 18 und 6/43 ebenfalls signifikant ab ($P < 0,05$), während sich dagegen die Peptide 41-6 nicht unterscheiden (Abb.30 C). Ebenfalls wie bei BALB/b führte auch hier bereits das Fehlen lediglich der Glutaminsäure an Position 376 zu einem drastischen Verlust der spezifischen Bindung von Antikörpern.

Die diffusen Bindungsraten der Peptide 31-36 (Abb.30 C) sind wahrscheinlich unspezifische Bindungen. Denn betrachtet man die Intensität der Antikörperbindung identischer Peptide in diesem Bereich (9 und 46, 10 und 47, 11 und 48), so unterscheiden sich diese jeweils statistisch signifikant von einander ($P < 0,05$).



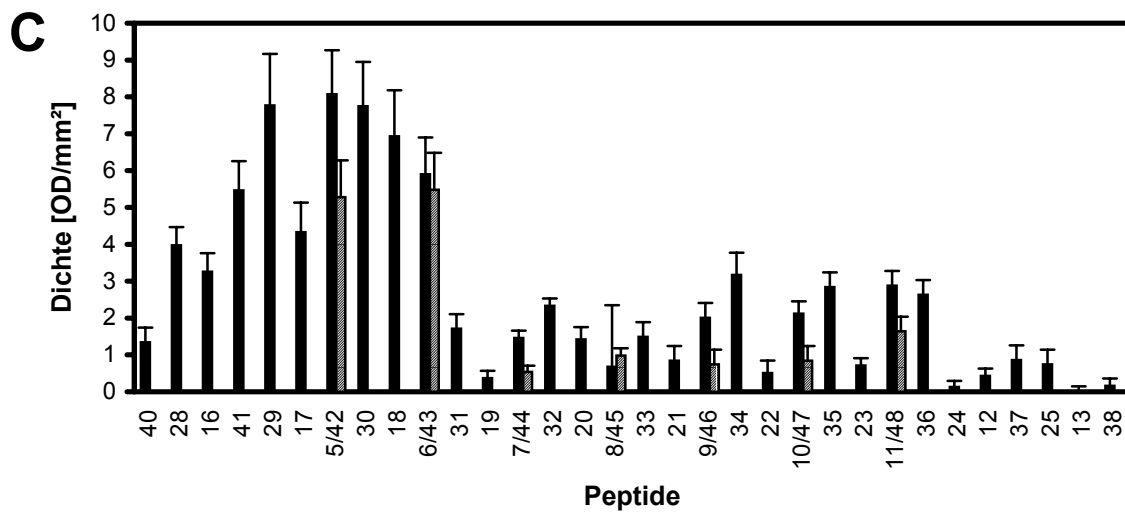


Abb.30: Identifizierung von B-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI bei dem congenen Mausstamm BALB/k mittels ELISA (A) und Antigenbindungstest (B+C). Die Auswertung erfolgte photometrisch (A) bzw. densitometrisch (B+C). Die in B dargestellte Peptidreihenfolge entspricht der Anordnung auf der Membran, d.h. aufeinander folgende Peptide sind um drei Aminosäuren versetzt, während in C solche Peptide aufeinander folgen, die nur um eine Aminosäure verschoben sind. Identische Peptide in C sind durch schraffierte Säulen dargestellt. Die Standardabweichung ist durch vertikale Linien angezeigt.

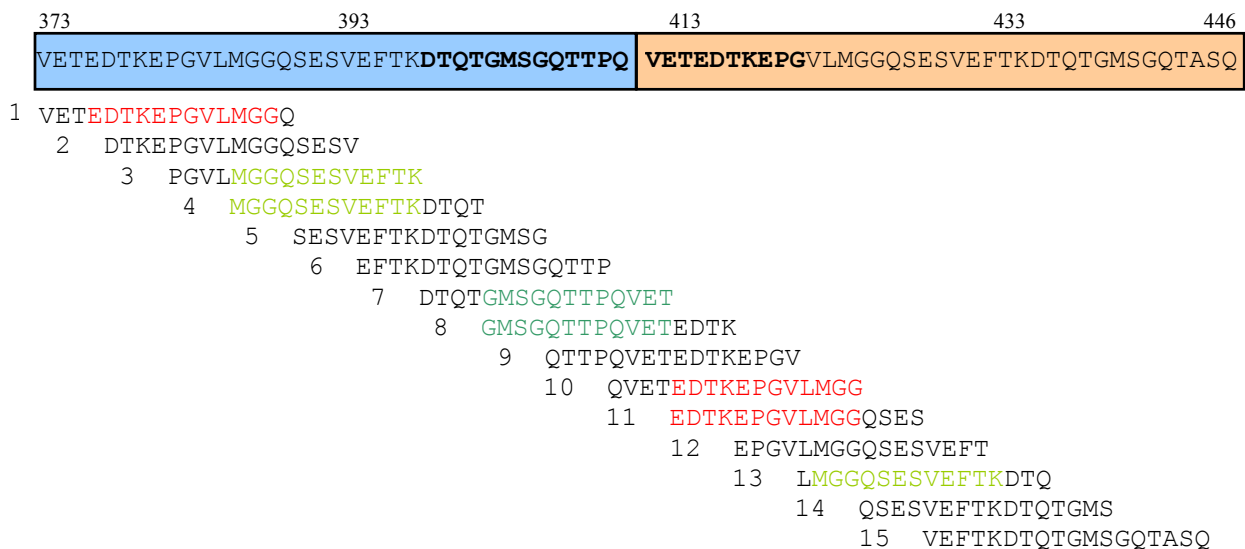


Abb.31: Für das Epitop-Mapping der fibronectinbindenden *Repeats* eingesetzte Peptide. Die aus 16 Aminosäuren bestehenden Peptide umfassen den Bereich der ersten beiden *Repeats* von Position 373 bis 446 des Proteins SfbI. Die experimentell ermittelten Bereiche, in denen lineare B-Zellepitope enthalten sind, sind farblich hervorgehoben (BALB/c: grün, BALB/b und BALB/k: rot), der Bereich, der das T-Zellepitop für BALB/c enthält, ist in der oberen Sequenz fett markiert.

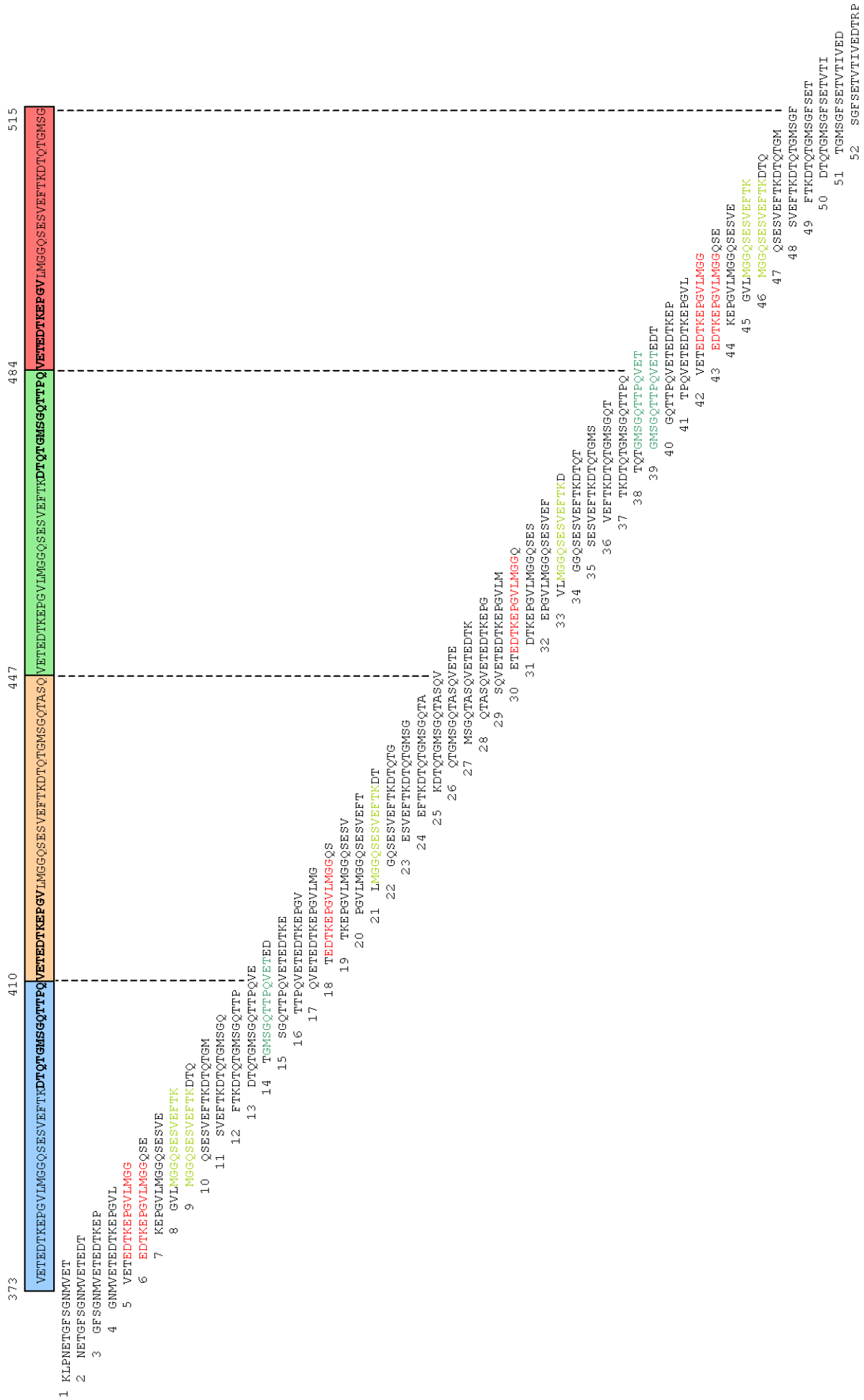


Abb.32: Sequenzen der membrangebundenen Peptide zur Identifizierung der B-Zellepitope innerhalb der Fibronectin-Bindungs-Repeats des Proteins Sfbl mittels des Antikörperbindungstests (II 7.3.8). Die experimentell ermittelten Bereiche, in denen lineare B-Zellepitope enthalten sind, sind farblich hervorgehoben (BALB/BALB/b und BALB/k: rot), der Bereich, der das T-Zellepitop für BALB/c enthält, ist in der oberen Sequenz fett markiert.

2.2 Charakterisierung von T-Zell-Epitopen

Zur Identifizierung der T-Zell-Epitope wurden die 15 unter 2.1 beschriebenen Peptide (Tab.13) ohne Biotinylierung eingesetzt. Nach Immunisierung der Mäuse (II 7.1.1) wurden wie unter II 7.3.1 beschrieben Proliferations-Assays durchgeführt. Da der Unterschied zwischen der durch Peptid 8 stimulierten Proliferationsrate und den durch die benachbarten Peptide stimulierten Proliferationsraten statistisch nicht signifikant war, lässt sich der Bereich für ein mögliches T-Zell-Epitop lediglich auf den Übergang vom ersten zum zweiten *Repeat*, d.h. zwischen Position 393 und 428 beschränken (Abb.34).

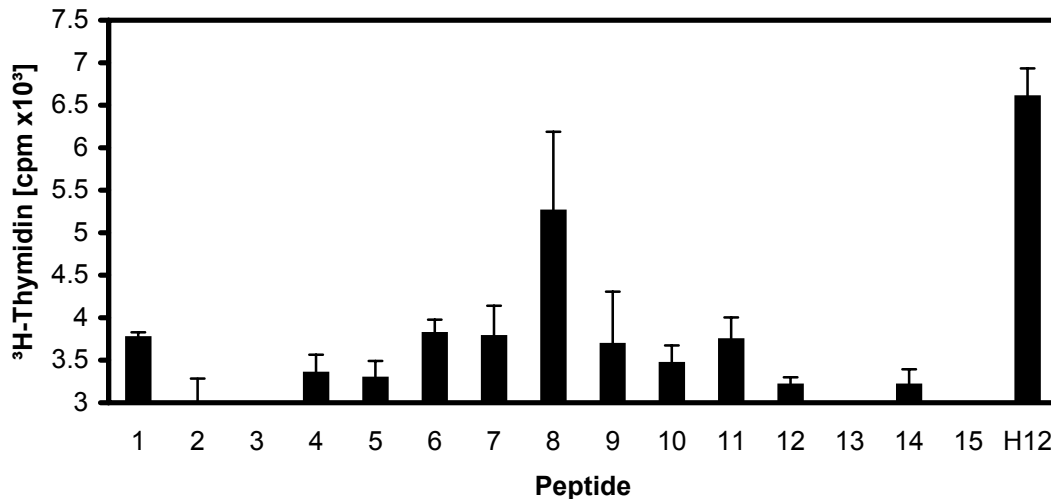
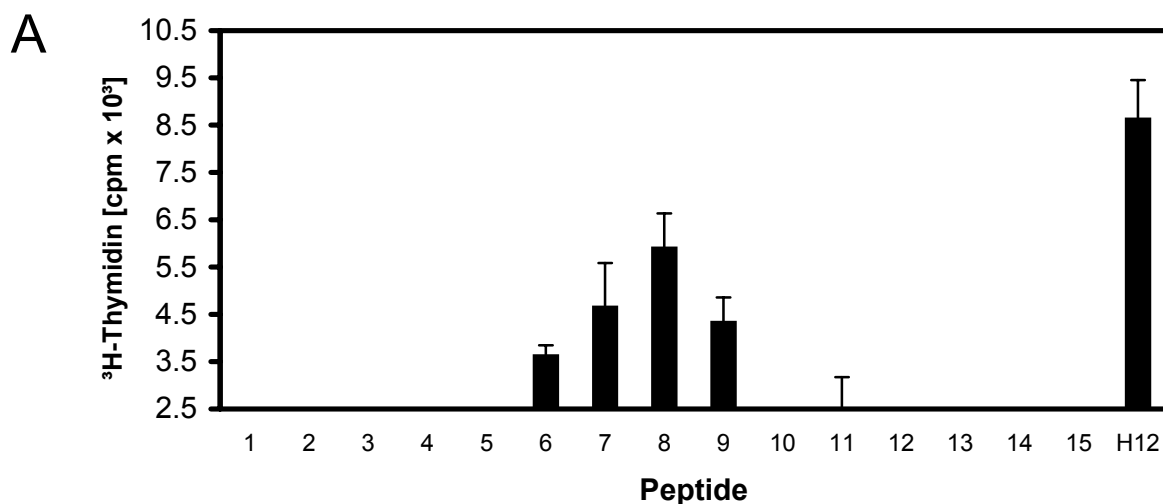


Abb.34: Proliferations-Assay zur Identifizierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsdomäne (H12). Die 15 verwendeten Peptide umspannen die ersten zwei Repeats. Die Peptide 1 und 11, 2 und 12, 3 und 13, 4 und 14 und 5 und 15 sind in Folge der Repeats um drei Aminosäuren und die Peptide 2 und 11, 3 und 12, 4 und 13 und 5 und 14 jeweils nur um eine Aminosäure verschoben. Die Skala beginnt oberhalb der Kontrolle. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt

Um die Natur der proliferierenden Zellen zu bestimmen, wurden aus Milzen gewonnene Zellkulturen, aus denen zuvor jeweils eine Zellpopulation entfernt wurde (II 7.3.2), in Proliferations-Assays eingesetzt. Die Deletion von B-Zellen führte bei den Peptiden 1-5 und 10-15 zu einer fehlenden Stimulation der T-Zellen, während bei den Peptiden 6-9 keine Auswirkung zu beobachten war. Außerdem lässt sich die Region eines potentiellen Epitops weiter auf den Bereich zwischen Position 397 bis 420 eingrenzen, da sich die durch die Peptide 6, 10 und 11 stimulierten Proliferationsraten statistisch signifikant von der durch Peptid 8 stimulierten Rate unterscheiden, die der Peptide 7 und 9 hingegen nicht (Abb.35 A). Die Deletion der CD4-T-Zellen hingegen hatte bei allen 15 Peptiden und der Positivkontrolle deutlich verminderte Proliferationsraten zur Folge (Abb.35 B). Es ist daher davon auszugehen, dass das zwischen Position 397 und 420 gelegene Epitop von CD4+ T-Zellen erkannt wird.



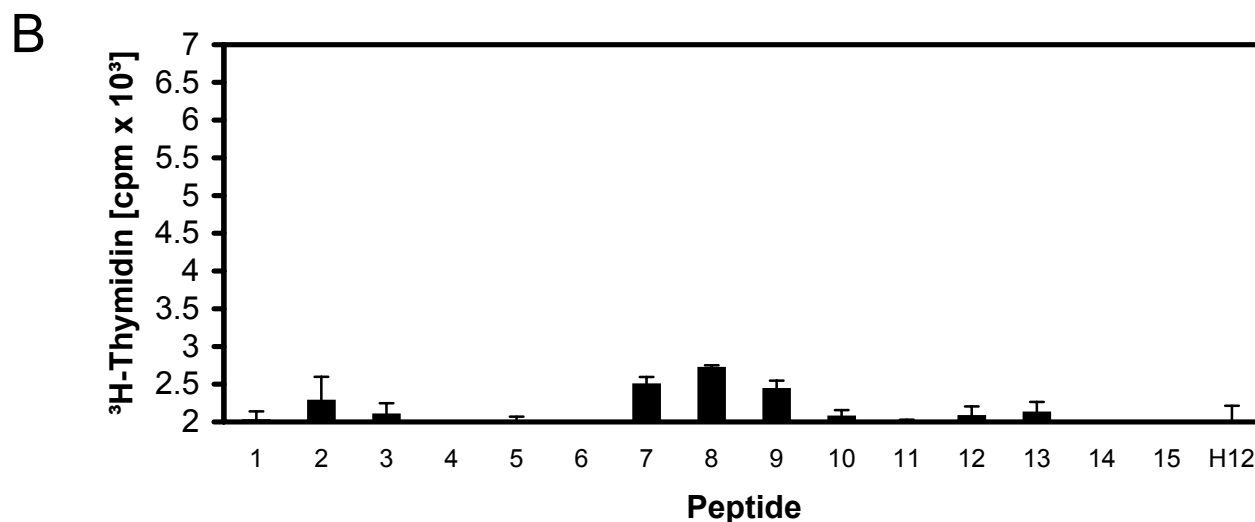


Abb.35: Proliferations-Assays zur Identifizierung der proliferierenden Zellpopulation nach Deletion von B-Zellen (A) bzw. CD4⁺-T-Zellen (B). Die 15 verwendeten Peptide umspannen die ersten zwei *Repeats*. Die Skala beginnt oberhalb der Kontrolle. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

Ein Vergleich mit vorhergesagten MHC II-Motiven nach Rammensee *et al.* (1999) zeigt für den detektierten Bereich zwischen Position 397 und 420 die Möglichkeit verschiedener Epitope. Ferner zeigt sich auch die Möglichkeit eines MHC II-Motivs für den menschlichen Haplotyp HLA-DRB1 *0401 (DR4Dw4) in dieser Region (Tab.15). Die Sequenz mit der größten Wahrscheinlichkeit eines Motivs des Haplotyps H2-Ak stimmt mit Peptid 8 überein, welches sich in den Proliferations-Assays als am effizientesten erwiesen hat (Abb. 34).

Tab.15: Vorhersage von MHC II-Motiven für Mäuse des Haplotyps IA^k und für den menschlichen Haplotyp HLA-DRB1 *0401 (DR4Dw4) mittels des Algorithmus' SYFPEITHI nach Rammensee *et al.* (1999). Aufgelistet sind die drei Peptide, welche den Bereich des detektierten T-Zellepitops umfassen.

| Peptid | Aminosäurenposition | Grad der Wahrscheinlichkeit für H2-Ak 15-mere | Grad der Wahrscheinlichkeit für HLA-DRB1 *0401 (DR4Dw4) 15-mere |
|--------|---------------------|---|---|
| | 123456789012345 | | |
| 7 | DTQTGMSGQTTPQVET | 8 | 12 |
| 8 | GMSGQTTPQVETEDTK | 10 | 12 |
| 9 | QTTTPQVETEDTKEPGV | 8 | 12 |

3. Fibronektinbindendes Protein SfbI von *Streptococcus pyogenes* als Adjuvans

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das fibronektinbindende Protein SfbI von *S. pyogenes* Adjuvanseigenschaften besitzt (Medina *et al.* 1998). Die chemische Kopplung des schwach immunogenen Ovalbumins (Ova) aus dem Huhn an SfbI führte zu einer deutlich stärkeren mukosalen, humoralen und zellulären Immunantwort gegen Ova. Die Nachteile

solcher generierten chimären Proteine bestehen jedoch darin, dass zunächst zwei Proteine aufgereinigt werden müssen, das Antigen und das Adjuvans, wodurch die Herstellung aufwendiger ist und mehr Kosten verursacht. Je nach gewählter Methode müssen für die chemische Kopplung spezielle Aminosäuren in den Proteinen vorhanden sein, was möglicherweise eine Einschränkung in der Auswahl der Antigene darstellt. Schließlich müssen nach dem Prozess der Kopplung die benötigten, meist toxischen Chemikalien wieder von dem Impfstoff getrennt werden, wodurch die Herstellung des Impfstoffs abermals aufwendiger und teurer wird.

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Aufreinigung und Handhabung des gesamten SfbI Proteins sehr schwierig ist und schließlich auch die Größe des Proteins für einen potentiellen Impfstoff von Nachteil wäre. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob an Stelle der chemischen Kopplung die Fusion des Modellantigens mit dem Adjuvans die gleiche Effizienz erbringt und welcher Bereich des SfbI über die Adjuvanseigenschaft verfügt.

3.1 Klonierung des Ovalbumin aus dem Huhn in den prokaryontischen Expressionsvektor pQE30

Zunächst wurde das für Ova kodierende Gen wie unter II 5.5.1 beschrieben mittels PCR amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer wurden so kreiert, dass das erhaltene Produkt am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Bgl*II- (Primer KSC1 und KSC2, II Tab.11) Schnittstelle aufwies. Darüber hinaus wurde außerdem mittels des *Reverse*-Primers ein Glycin-Serin-Linker (GSGSG, Argos 1990) eingebracht, der den Erhalt der jeweiligen Sekundärstruktur von Ova und SfbI gewährleisten soll.

Das PCR-Produkt wurde zunächst adenyliert (II 5.5.2) und anschließend gemäß den Angaben des Herstellers in den Klonierungsvektor pCR2.1 der Firma Invitrogen ligiert und in den *E.coli* Stamm XL1-Blue transformiert. Die Detektion positiver Klone erfolgte über Blau-Weiß-Selektion. Nach Anreicherung eines positiven Klons wurde die Plasmid-DNA gewonnen (II 5.1.1) und das für Ova kodierende Gen mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Bgl*II aus pCR2.1 herausgeschnitten. Nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel (II 5.2.1) und darauf folgender Gelelution (II 5.2.3) wurde Ova in die durch Restriktion mit *Bam*HI linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektoren pSTH2, pSTH10 bzw. pSTH12 (Abb.36) ligiert. Die erhaltenen Konstrukte wurden anschließend in elektrokompente XL1-Blue transformiert.

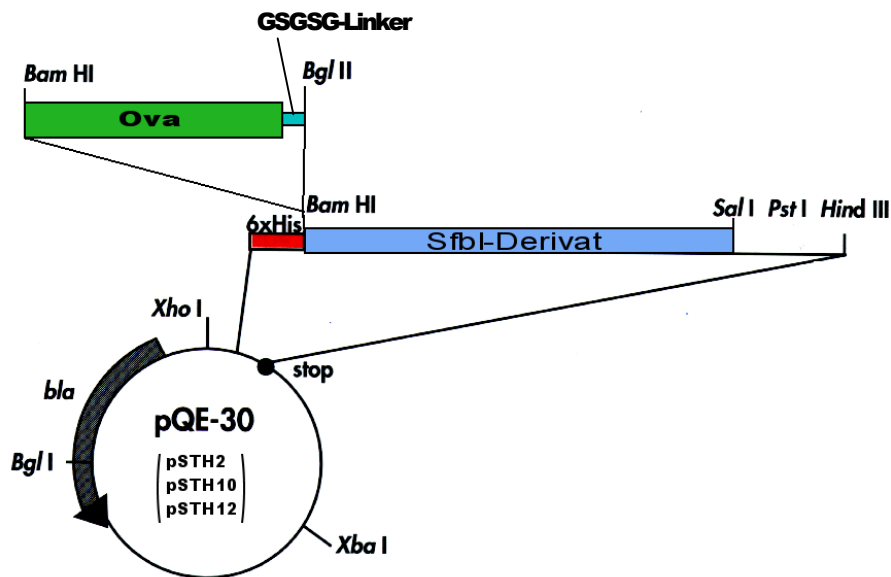


Abb.36: Klonierung von Ovalbumin in die Expressionsvektoren pSTH2, pSTH10 und pSTH12.

Zur Überprüfung der Insertionsrichtung wurde wiederum aus einigen Klonen die Plasmid-DNA isoliert und diese mit dem Restriktionsenzym *Pst*I gespalten. Bei richtiger Orientierung des Ova kodierenden Gens wurden folgende Fragmentgrößen erwartet: 2,41 kb und 3,8 kb für pSTH2, 1,66 kb und 3,8 kb für pSTH10 und für pSTH12 1,36 kb und 3,8 kb (Abb.37).

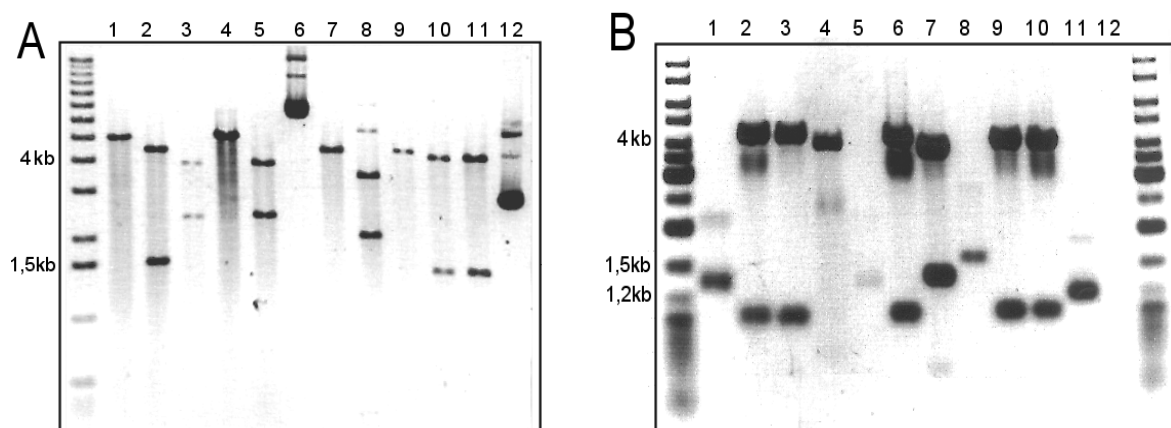


Abb.37: Überprüfung der Insertionsrichtung des Ovalbumin-Gens in pSTH2 (A, Bahn 1-6), pSTH10 (A, Bahn 7-12) und pSTH12 (B, Bahn 1-12) durch Restriktion mit *Pst*I. Die positiven Klone sind durch Pfeile markiert.

Nach Plasmidpräparation aus positiven Klonen wurden die Konstrukte sequenziert, um die erfolgreiche Insertion des Ova-Gens *in frame* mit dem His-Tag und dem jeweiligen SfbI-Derivat zu bestätigen (Abb.38). Schließlich wurden die Plasmide in den Expressionsstamm *E.coli* M15 transformiert.

```

M R G S H H H H H H H G S M G S I G A A S M E F C F D V F K E L K V H
1 ATGAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC GGATCCATGG GCTCCATCGG CGCAGCAAGC ATGGAATTTT GTTTTGATGT ATTCAAGGAG CTCAAAGTCC
TACTCTCCTA GCGTAGTGGT AGTGGTAGTG CCTAGGTACC CGAGGTAGCC GCGTCGTTCC TACCTTAAAA CAAACTACAA TAAGTTCCTC GAGTTTCAGG
• H A N E N I F Y C P I A I M S A L A M V Y L G A K D S T R T Q I N
101 ACCATGCCAA TGAGAACATC TTCTACTGCC CCATTGCCAT CATGTCAGCT CTAGCCATGG TATACCTGGG TGCAAAAGAG AGCACCAGGA CACAGATAAA
TGGTACGGTT ACTCTGTAG AAGATGACGG GGTAAACGGTA GTACAGTCGA GATCGGTACC ATATGGACCC ACGTTTTCTG TCGTGGCTCT GTGTCTATTT
• K V V R F D K L P G F G D S I E A Q C G T S V N V H S S L R D I L
201 TAAGTTGTGT CGCTTTGATA AACTTCCAGG ATTCGGAGAC AGTATTGAAG CTCAGTGTGG CACATCTGTA AACGTTCACT CTTCACCTAG AGACATCCTC
ATTCCAACAA GCGAAACTAT TTGAAGGTCC TAAGCCTCTG TCATAACTTC GAGTCACACC GTGTAGACAT TTGCAAGTGA GAAGTGAATC TCTGTAGGAG
N Q I T K P N D E Y S F S L A S R L Y A E E R Y P I L P E Y L R V A S
301 AACCAAATCA CCAAACCAAA TGATGTTTAT TCGTTCAGCC TTGCCAGTAG ACTTTATGCT GAAGAGAGAT ACCCAATCCT GCCAGAATAC TTGCAGTGTG
TTGGTTTAGT GGTTTGGTTT ACTACAATA AGCAAGTCGG AACGGTCATC TGAATACGA CTTCTCTCTA TGGGTTAGGA CGGTCTTATG AACGTCACAC
• K E L Y R G K L E P I N F Q T A A D Q A R E L I N S W V E S Q T N
401 TGAAGGAAGT GTATAGAGGA GGCTTGGAAC CTATCAACTT TCAAACAGCT GCAGATCAAG CCAGAGAGCT CATCAATTCC TGGGTAGAAA GTCAGACAAA
ACTTCTCTGA CATATCTCCT CCGAACCTTG GATAGTTGAA AGTTTGTGCA CGTCTAGTTC GGTCTCTCGA GTAGTTAAGG ACCCAATCTT CAGTCTGTGT
• G I I R N V L Q P S S V D S Q T A M V L V N A I V F K G L W E K T
501 TGAATATATC AGAAATGTCC TTCAGCCAAG CTCCTGGGAT TCTCAAACCT CAATGGTTCT GGTAAATGCC ATTGTCTTCA AAGGACTGTG GGAGAAAACA
ACCTTAATAG TCTTTACAGG AAGTCGGTTC GAGGCACCTA AGAGTTTGAC GTTACAAGA CCAATTACGG TAACAGAAGT TTCTGACAC CCTCTTTTGT
F K D E D M P F R V T E Q E S K P V Q M M Y Q I L P L F R V A S
601 TTTAAGGATG AAGACACACA AGCAATGCCT TTCAGAGTGA CTGAGCAAGA AAGCAAACCT GTGCAGATGA TGTACCAGAT TGGTTTTATT AGAGTGGCAT
AAATCTCTAG TTCTGTGTGT TCGTTACGGA AAGTCTCACT GACTCGTTCT TTCGTTTGGG CACGTCTACT ACATGGTCTA ACCAAATAAA TCTCACCGTA
• M A S E K M L P E A S G T M S M L V L L P D E V S G L E Q
701 CAATGGCTTC TGAGAAAATG AAGATCCTGG AGCTTCCATT TGCCAGTGGG ACAATGAGCA TGTGGTGTCT GTTGCTGAT GAAGTCTCAG GCCTTGAGCA
GTTACGAAG ACTCTTTTAC TTCTAGGACC TCGAAGGTAA ACGGTCAACC GTTTACTCGT ACAACCAGA CAACGGACTA CTTCAAGATC CGGAACCTGT
• L E S I I N F D E K L T E W T S S N V M E E R K I K V Y L P R M K M
801 GCTTGAGAGT ATAATCAACT TTGAAAAACT GACTGAATGG ACCAGTTCTA ATGTTATGGA AGAGAGGAAG ATCAAAGTGT ACTTACCTCG CATGAAGATG
CGAAGTCTCA TATTAGTTGA AACTTTTGA CTGACTTACC TTGGTCAAGT TACAATACCT TCTCTCTCTC TAGTTTCACA TGAATGGAGC GTACTTCTAC
E K Y N L T S V L M A M G I T D V F S S S A N L K R F E G I S S A E S L
901 GAGGAAAAAT ACAACCTCAC ATCTGTCTTA ATGGCTATGG GCATTACTGA CGTGTTTAGC TCTTCAGCCA ATCTGTCTGG CATCTCTCA GCAGAGAGCC
CTCCTTTTTA TGTGGAGTG TAGACAGAA TACCGATACC CGTAATGACT GCACAAATCG AGAAGTCGGT TAGACAGACC GTAGAGGAGT CGTCTCTCGG
• K I S Q A V H A A E I N E A G R E V V G S A E A G V D A A S V
1001 TGAAGATATC TCAAGCTGTC CATGCAGCAC ATGCAGAAAT CAATGAAGCA GGCAGAGAGG TGGTAGGGTC AGCAGAGGCT GGAGTGGATG CTGCAAGCGT
ACTTCTATAG AGTTTCGACG GTACGTCGTG TACGTCTTTA GTTACTTCGT CGGTCTCTCC ACCATCCAG TCGTCTCCGA CTTCACTCAG GACGTTCCGA
• S E E F R A D H P F L F C I K H I A T N A V L F F G R C V S P G S
1101 CTCTGAAGAA TTTAGGGCTG ACCATCCATT CCTTCTCTGT ATCAAGCACA TCGCAACCAA CGCGGTTCTC TTCTTTGGCA GATGTGTTTC CCCTGGTCTG
GAGACTTCTT AATCCCGAC TGGTAGGTAA GGAGAAGACA TAGTTCTGTG AGCGTGTGGT GCGGCAAGAG AAGAAACCGT CTACACAAAG GGGACCAAGA
G S G R S D E K T V P H R V S Q N P E F P W Y G Y D F Y K G P Y T R
1201 GGGCTGGGTA GATCCGATGA GAAGACTGTG CCTCATAGAG TTAGTCAAAA TCCTGAGTTT CCCTGGTATG GTTATGATTT CTACAAAGGA CTTTACACAA
CCGAGACCAT CTAGGCTACT CTTCTGACAC GGAGTATCTC AATCAGTTTT AGGACTCAAA GGGACCATAC CAATACTAAA GATGTTTCTT GGAATGTGTT
• Y H N L Q L N L N G S K T Y Q A Y C F N L K R F E P K K E G S Y F
1301 GATATCATAA TTTACAGCTA AATCTCAACG GAAGTAAAC ATATCAGGCT TATTGTTTTA ATTTAAAGAG ATTTGAACCT AAGAAAGAAG GTAGTTATTT
CTATAGTATT AAATGTCGAT TTAGAGTTGC CTTCAATTTG TATAGTCCGA ATAACAAAAA TAAATTTCTC TAAACTTGGA TTCTTTCTTC CATCAATAAA
• P N W F R A R W D G S E E T F V K Y A D N P R K D N E S S R T V I D V
1401 TCCGAATTGG TATAAGAGGT GGGATGGTAG TGAAGAGACA TTGTGTAATAT ATGCTGATAA CCCAGAAAAA GATAATGAAA GTTCCAGAGT TATAGATGTA
AGGCTTAACC ATATTCTCCA CCTTACCATT ACTTCTCTGT AAACATTTTA TACGACTATT GGGGTCTTTT CTATTACTTT CAAGGTCTCA ATATCTACAT
E L E K N I L R V L Y N G Y P N N G N G I M E G L E P L N A I L V T
1501 GAATTAGAAA AAAATATATT AAGAGTGTGA TATAATGGAT ATCCGAATAA CGGTAAATGA ATCATGGAGG GTTTAGAACCT ATTAAATGCT ATCTTAGTAA
CTTAATCTTT TTTTATATAA TTCTCAGCAT ATATTACCTA TAGGCTTATT GCCATTACCT TAGTACCTCC CAAATCTTGG TAATTATACG TAGAATCATT
• Q N A V W Y Y S D N S S I F N T D N F T E A K D L N I K P E Q
1601 CTCAAAATGC TGTTTGGTAC TATTCTGATA ATTCATCTAT TTTTAATACT GATAACTTCT TTACGACTGA AGCTAAAGAT CTTAATATAA AACCTGAGCA
GAGTTTACG ACAACCATG ATAAGACTAT TAAGTAGATA AAAATATTATG CTATTGAAGA AATGCTGACT TCGATTTCTA GAATTAATT TTGGACTCGT
• L S L M R V A L K K L I D P K L S E E S L K P V P S T F R L N I F
1701 ATTATCATTA ATGCGTGTTC CATTAAGAA ATTGATAGAT CCTAAGTTAT CTGAAGAACT ATTGAAACCT GTGCGATCTA CTTTGTAGCT TAATATTTTC
TAATAGTAAT TACGCAATAG GTAATTTCTT TAACATATCT GATTCTCAAT TAACATTTAG TAACATTTGG CACGTTAGAT GAAATCTGTA CTAATAAAAA
E S Q D K L Y Q N L L S A E F V P E N P P K P G E T P E H G P K T P
1801 GAATCTCAGG ATAAGCTATA TCAAAATCTT CTAAGTGCTG AGTTTGTACC AGAAAAATCC CCTAAACCTG GTGAAACCCC TGAACATGGA CCCAAACTC
CTTAGAGTCC TATTGATAT AGTTTTAGAA GATTCAAGAC TCAAAACATGG TCTTTTAGGG GATTTTGGAC CACTTGGGCT ACTTGTAGG GGTTCAGG
• E L D G T P I P E G P Q R P N E S L E P T L P P V M L D G Q E V P
1901 CCGAGTTGGA TGGCACTCCA ATTCGCCAAG GCCCACACGC TCCAAATGAG AGTTTAGAAC CTACGCTTCC ACCAGTATG CTAGACGGAC AAGAAGTCCC
GGCTCAACCT ACCGTGAGGT TAAGGGCTTC CCGGTGTTTC AGGTTTACTC TCAAACTCTG GATCGGAAGG TGTCACATG GATCTGCCTG TTCTTACGG
• E V P S E S L E P A L P P L M P E L D G Q E V P E V P S E S L E P
2001 CGAAGTTCCA AGTGAGAGCT TAGAACCTGC GCTTCCCCCA TTGATGCCAG AGCTAGATGG CCAAGAAGTC CCAGAAGTCT CAAGCGAGAG CTTAGAACCT
GGTTCAGGT TCACTCTCGA ATCTTGGACG CCAAGGGGGT AACTAGCGGC TCGATCTACC GGTCTCTCAG GGTCTCTCAAG GTTCTGCTAG GTTCTTGG
A L P P L M P E L D G Q E V P E K P S V D L P I E D P R Y E F N N K
2101 GCGCTTCCCC CATTGATGCC AGAGTTAGAT GGTCAAGAAG TCCCTGAAAA ACCTAGTGTG GACTTACCTA TTGAAGATAG TCGTTATGAG TTTAACAATA
CGCGAAGGGG GTAACACACG TCTCAATCTA CCAAGTTCTC AGGAGCTTTT AGGAGTACAA CTGAAATGAT AACTTCTAGG TTTTGAAGG TTTTGAAGG
• D Q S P L A G E S G E T E Y I T E V Y G N Q Q N P V D I D K K L P
2201 AAGACCAATC ACCTCTAGCG GGTGAGTCTG GTGAGACGGA GTATATTACC GAAGTTTATG GAAATCAACA GAACCTGTGT GATATTGATA AAAAAGTTC
TTCTGGTTAG TGGAGATCGC CCACTCAGAC CACTCTGCCT CATATAATGG CTTCAAATAG CTTTAGTTGT CTTGGGACAA CTATAACTAT TTTTGAAGG
• N E T G F S G N M V E T E D T K E P G V L M G G Q S E S V E F T K
2301 GAATGAAACA GGTTTTTTTC GAAATATGGT TGAGACAGAA GATACGAAAG AGCCAGGAGT GTTGATGGGA GGTCAAAGTG AGTCTGTGTA ATTTACTATA
CTTACTTTGT CCAAAAAGTC TTTTATACCA ACTCTGTCTT CATGCTCTTC CCACTACCTC CAGTCTTTC TCAGACAACCT TAATGATGTT TTTTGAAGG
D T Q T G M S G Q T T P Q V E T E D T K E P G V L M G G Q S E S V E
2401 GACACTCAAA CAGGCATGAG TGGTCAAAAC ACTCCTCAGG TTGAGACAGA AGACACGAAA GAGCCAGGAG TGCTGATGGG AGGTCAAAGT GAGTCTGTG
CTGTGAGTTT GTCCGTACTC TCGAGAGTCC AACTCTGTCT TCTGTGCTTT CTGCTGCTCT CCACTACCTC TCCAGTTTCA CTGACACAA
• F T K D T Q T G M S G Q T A S Q V E T E D T K E P G V L M G G Q S

```

```

2501 AATTTACCAA AGATACTCAA ACAGGCATGA GTGGTCAAAC AGCTTCTCAG GTTGAGACAG AAGATACGAA AGAGCCAGGA GTGCTGATGG GAGGCCAAAG
    TTAAATGGTT TCTATGAGTT TGTCGGTACT CACCAGTTTG TCGAAGAGTC CAACTCTGTC TTCTATGCTT TCTCGGTCCT CACGACTACC CTCCGGTTTC
    • E S V E F T K D T Q T G M S G Q T T P Q V E T E D T K E P G V L M
2601 TGAGTCTGTT GAATTTACTA AAGACACTCA AACAGGCATG AGTGGTCAAA CAACTCCTCA GGTTGAGACA GAAGACACGA AAGAGCCAGG AGTATTGATG
    ACTCAGACAA CTAAATGAT TTCTGTGAGT TTGTCCGTAC TCACCAGTTT GTTGAGGAGT CCAACTCTGT CTTCTGTGCT TTCTCGGTCC TCATAACTAC
    G G Q S E S V E F T K D T Q T G M S G F S E T V T I V E D T R P V D
2701 GGAGGTCAAA GTGAATCTGT TGAATTTACT AAAGACACTC AACAGGCAT GAGCGGTTTC AGTGAAACAG TGACCATTTG TGAAGATACC CGTCCGGTCG
    CCTCCAGTTT CACTTAGACA ACTTAAATGA TTTCTGTGAG TTTGTCCGTA CTCGCCAAG TCACTTTGTC ACTGGTAACA ACTTCTATGG GCAGGCCAGC
    • L Q P S L I S *
2801 ACCTGCAGCC AAGCTTAATT AGCTGA
    TGGACGTCGG TTCGAATTAA TCGACT

```

Abb.38: Sequenz der Fusionsproteine bestehend aus His-Tag (fett), Ovalbumin (rot), GS-Linker (grün) und einem SfbI-Derivat am Beispiel H2 (blau). Die Insertionsschnittstellen sind durch eine hochstehende Linie markiert.

3.2 Charakterisierung der für die Adjuvanseigenschaft verantwortlichen Domäne

Für die Charakterisierung der Adjuvanseigenschaft wurden die generierten His-Tag-Proteine bestehend aus einem der SfbI-Derivate H2, H10 bzw. H12 (Abb.9) und Ova aufgereinigt (II 6.) und intranasal wie unter II 7.1.1 beschrieben an die Mäuse verabreicht. Von jedem Fusionsprotein wurden pro Maus und Immunisierung je 680 pmol gegeben.

Die Vakzinierung von Mäusen mit den Fusionsproteinen H2::Ova, H10::Ova und H12::Ova führte lediglich zu einer geringen Steigerung der humoralen Immunantwort mit etwa viermal mehr anti-Ova IgG im Serum gegenüber der Vakzinierung mit Ova allein (Abb.39).

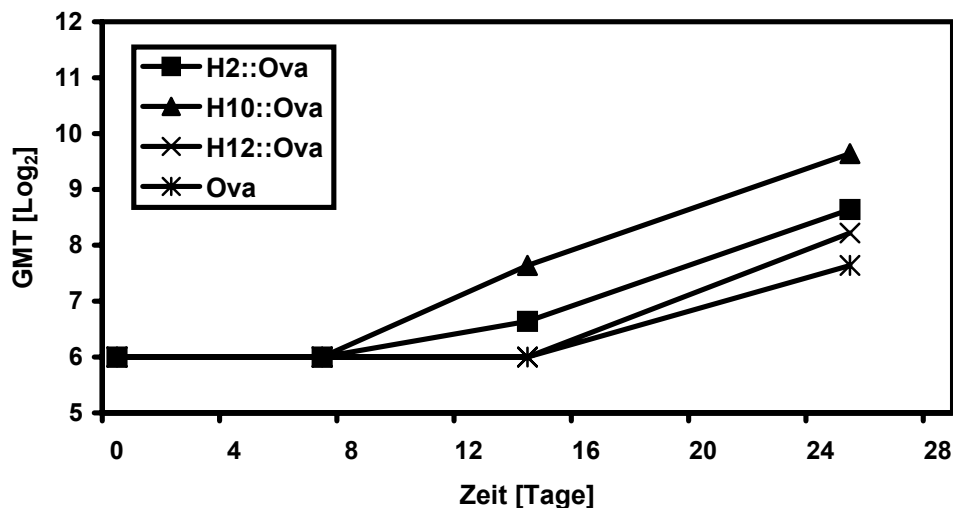


Abb.39: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch die Fusionsproteine. Die Ergebnisse sind als reziproker Log₂ des geometrischen Mittelwertes des Endpunkttiters (GMT) von fünf Mäusen pro Gruppe dargestellt.

Darüber hinaus konnte in den Lungenwaschungen der Tiere kein spezifisches gegen Ova gerichtetes IgA detektiert werden (Daten nicht gezeigt) und auch die zelluläre Immunantwort gegen Ovalbumin wurde durch die SfbI-Derivate nicht verstärkt (Abb.40).

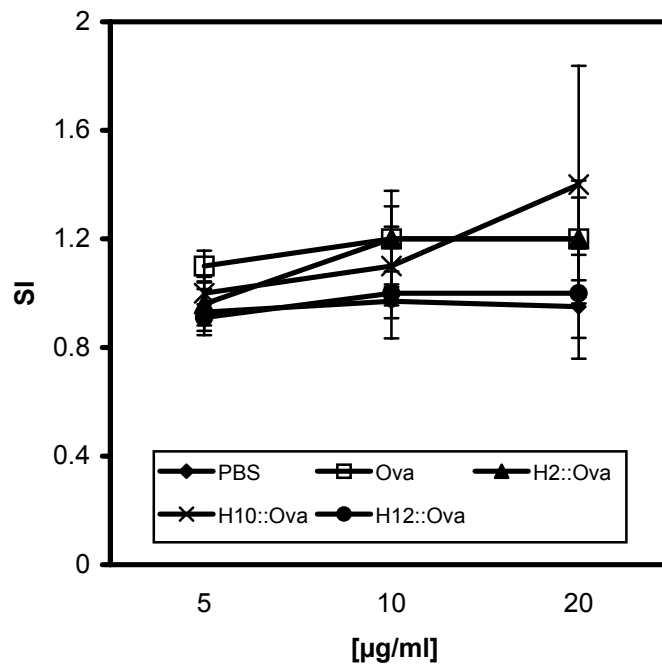


Abb.40: Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit verschiedenen His-Tag-Fusionsproteinen bestehend aus dem Modellantigen Ova und einem SfbI-Derivat. Die Proliferationsrate wurde nach drei Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens Ova durch Messung inkorporierten ^3H -Thymidins ermittelt. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindex (SI) angegeben. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

Die mangelnde Stimulierung von Immunantworten gegen Ova könnte auf eine Instabilität der Fusionsproteine zurückzuführen sein. Möglicherweise hatte darüber hinaus die Fusion des Modellantigens mit SfbI trotz Verwendung eines *Linkers* eine Veränderung der Sekundärstruktur eines oder beider Teilproteine zur Folge, wodurch die Immunantworten ebenfalls beeinträchtigt sein könnten. Darauf folgende Vakzinierungen (II 7.1.1) erfolgten daher nicht unter Verwendung von Fusionsproteinen, sondern Modellantigen und potentiell Adjuvans wurden koadministriert. Ferner wurde an Stelle des Ova nun β -Galaktosidase (β -Gal) eingesetzt, da in Wiederholungsversuchen mit Ova Probleme bei der Stimulation der T-Zellproliferation auftraten (Daten nicht gezeigt). Es wurden jeweils 92 pmol von β -Gal und erneut 680 pmol der SfbI-Derivate pro Maus und Immunisierung gegeben.

3.2.1 Antigen-spezifische, humorale Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit β -Galaktosidase koadministriert mit SfbI-Derivaten

Die Vakzinierung der Mäuse mit β -Gal als Modellantigen, koadministriert mit den SfbI-Derivaten H2, H10 oder H12, stimulierte gleichermaßen eine effiziente, humorale Immunantwort. Bereits nach der zweiten Immunisierung ließen sich im Gegensatz zur Impfung mit β -Gal allein für alle drei SfbI-Derivate hohe anti- β -Gal IgG-Titer im Serum detektieren. Eine Woche nach Gabe der dritten Immunisierung waren die IgG-Titer bei Koadministration mit dem Derivat H12 16 mal, bei H10 etwa 60 mal und bei dem Derivat H2 sogar ca. 100 mal höher als bei Vakzinierung mit β -Gal allein (Abb.41).

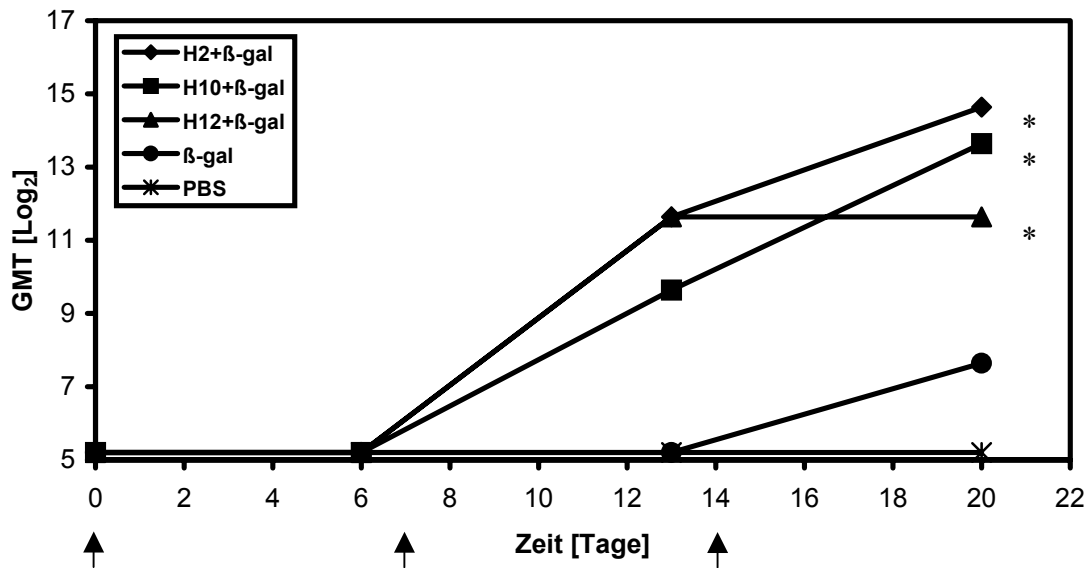


Abb.41: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch Koadministration von β -Gal und der SfbI-Derivate H2, H10 oder H12. Die Ergebnisse sind als reziproker Log_2 des geometrischen Mittelwertes des Endpunkttiters (GMT) von fünf Mäusen pro Gruppe dargestellt. Zwischen den einzelnen Gruppen und der Kontrollgruppe (β -Gal allein) besteht ein statistisch signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ (*, Student'schen t -Test). Die Immunisierungszeitpunkte sind durch Pfeile markiert.

Neben den Unterschieden bei der Stimulierung der anti- β -gal IgG-Bildung wurde außerdem untersucht, in wie weit sich die durch Immunisierung mit β -Gal zusammen mit den SfbI-Derivaten stimulierten IgG-Subklassen-Profile von dem der Kontrollgruppe (β -Gal allein) unterscheiden. Die erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, dass das Adjuvans in allen drei Fällen die Immunantwort in Richtung IgG1 verschiebt. Während die Immunisierung mit β -Gal allein gleiche Mengen IgG1 und IgG2b stimulierte, war IgG1 in Gegenwart des Adjuvans wesentlich dominanter als IgG2b. IgG2a und IgG3 wurden nicht stimuliert (Abb.42), so dass sich daraus schließen lässt, dass durch die SfbI-Derivate spezifisch Th2-Zellen stimuliert werden. Die von diesen Helferzellen sekretierten Cytokine fördern die humorale Immunantwort und können so für eine effiziente Beseitigung der Pathogene sorgen.

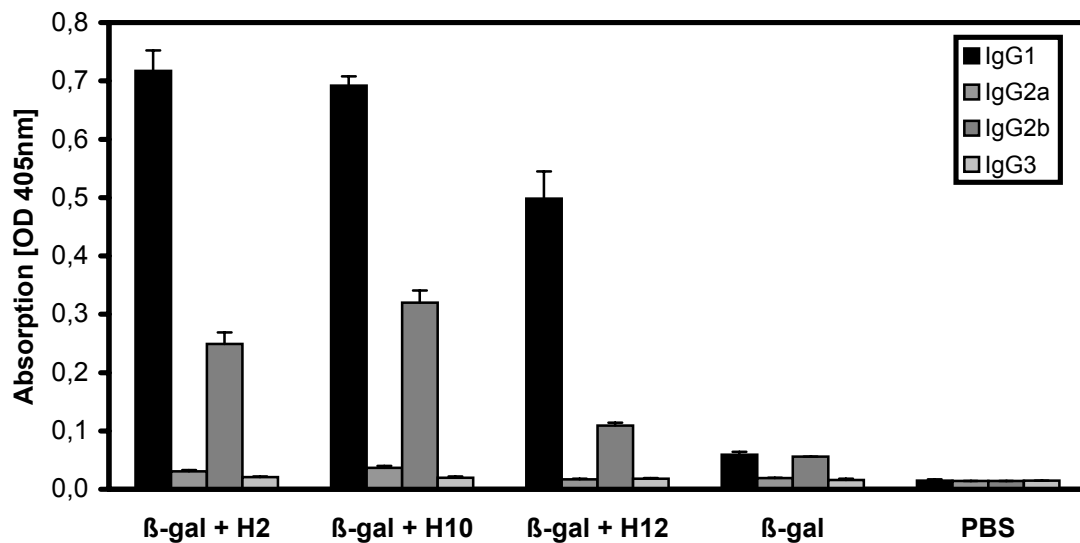


Abb.42: IgG-Isotypen-Muster der durch Vakzinierung mit β -Gal koadministriert mit den SfbI-Derivaten H2, H10 oder H12 hervorgerufenen spezifischen, humoralen Immunantwort. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

Die Charakterisierung der humoralen Immunantwort hat gezeigt, dass sowohl SfbI als auch die Derivate H10 und H12 die Antikörperbildung auf systemischer Ebene entscheidend fördern.

3.2.2 Antigen-spezifische, mukosale Antikörperantwort

Neben der Induktion systemischer Immunität stellt die Bildung sekretorischer IgA die wichtigste Abwehrfunktion überwiegend mukosaler Pathogene dar. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob SfbI, koadministriert mit dem Antigen, in der Lage ist, als mukosales Adjuvans zu wirken und damit die Bildung von antigen-spezifischer sIgA zu verstärken, und ob hierfür das gesamte Protein SfbI (H2) nötig ist oder ob ein verkürztes Fragment wie die fibronectin-bindende Region (H12) oder die prolinreiche Region (H10) ausreichen. Wie aus Abb. 43 hervorgeht konnten im Gegensatz zu solchen Mäusen, die lediglich mit β -Gal immunisiert wurden, in den Lungenwaschungen der Mäuse, die zusätzlich mit einem der SfbI-Derivate immunisiert wurden hohe Titer antigen-spezifischer sIgA detektiert werden.

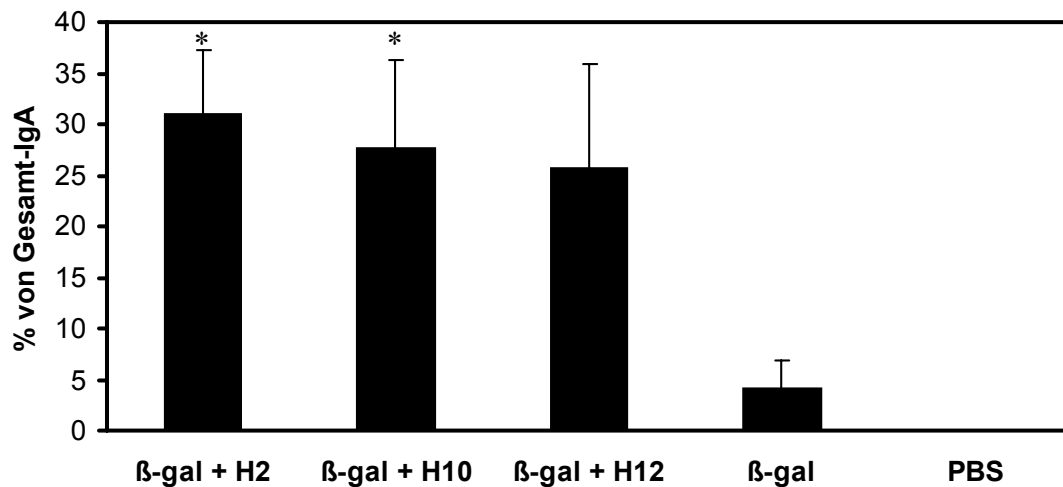


Abb.43: Antigenspezifische IgA in Lungenwaschungen aus Mäusen, die mit β -Gal allein und zusammen mit einem SfbI-Derivat vakziniert wurden. Der Anteil antigenspezifischer IgA an der Gesamtmenge sekretorischer IgA ist in Prozent dargestellt. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (β -Gal allein) und den Gruppen β -Gal + H2 und β -Gal + H10 mit $P < 0,05$ (*). Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

3.2.3 Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort nach intranasaler Immunisierung mit β -Galaktosidase koadministriert mit SfbI-Derivate

Wie bereits unter 1.4.3 erwähnt können je nach Struktur und Funktion des verwendeten Adjuvans Unterschiede in der Aktivierung von T-Zellen existieren. Ein Impfstoff gegen extrazelluläre Pathogene bedarf meistens eines Adjuvans, welches die humorale und vor allem mukosale Immunantwort fördert, um die Ansiedlung und Ausbreitung des Krankheitserregers zu verhindern. CTB z.B. wirkt zum einen in der Form, dass es durch Kostimulation die Produktion von Interleukin 4 (IL-4) durch aktivierte T-Zellen fördert (Li, T.-K. und Fox, B.S., 1996). IL-4 seinerseits aktiviert B-Zellen, es kommt zur klonalen Expansion, Differenzierung und Produktion von IgG1. Zum anderen induziert CTB durch TGF- β 1 in B-Lymphocyten einen Isotypenwechsel zu IgA (Kim, P.-H. *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurden die durch das Protein SfbI und dessen Derivate H10 und H12 stimulierten, zellulären Immunantworten gegen das Modellantigen β -Gal untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten wie schon bei den Versuchen mit Ova keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den durch Immunisierung mit und ohne SfbI-Derivat als Adjuvans stimulierten, zellulären Immunantworten (Abb.44).

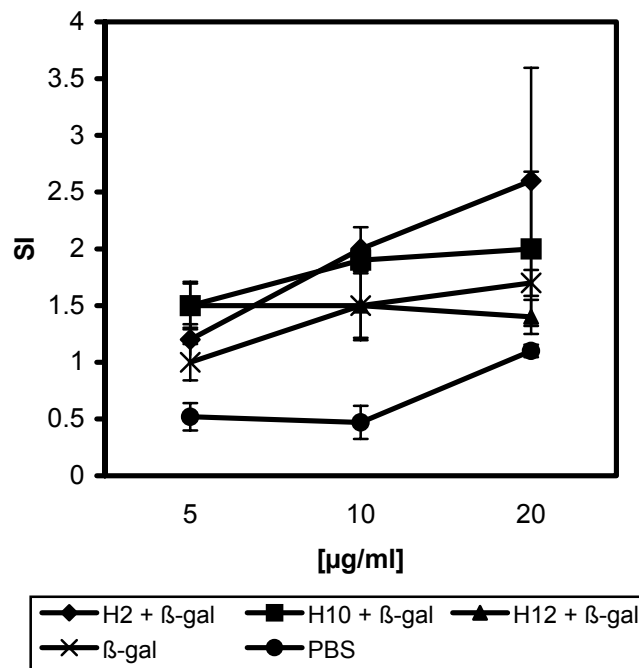


Abb.44: Antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit β -Gal und β -Gal koadministriert mit einem SfbI-Derivat. Die Proliferationsrate wurde nach drei Tagen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens β -Gal durch Messung inkorporierten ^3H -Thymidins ermittelt. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindex (SI) angegeben. Der Standardfehler ist durch vertikale Linien angezeigt.

Die Ursache für eine starke humorale Immunantwort gegen β -Gal trotz fehlender T-Zell-Antworten liegt wahrscheinlich in der Fähigkeit der fibronectinbindenden Domäne, B-Zellen unspezifisch aktivieren zu können (Medina *et al.*, 1998), begründet. Hierbei werden möglicherweise die durch β -Gal nur unzureichend aktivierten B-Zellen durch das koadministrierte SfbI unspezifisch stimuliert, wodurch es zur klonalen Expansion und vermehrten Expression von MHC II-Molekülen kommt (Medina *et al.*, 1998).

4. *Salmonella* spp. als Lebendimpfstoff gegen *S. pyogenes*

4.1 Generierung eines Expressionsvektors zur Sekretion der Fibronectin-Bindungsdomäne von SfbI durch *Salmonella* spp.

Als Alternative zur intranasalen Impfung mit aufgereinigten Proteinen sollte die Möglichkeit der mukosalen Vakzinierung mittels attenuierten *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium als Transporter untersucht werden. *S. typhimurium* dringen über die M-Zellen der Peyerschen Plaques in den Wirt ein und sind in der Lage, in den Phagosomen der Makrophagen zu überleben (Finlay and Falkow, 1989; Jones *et al.*, 1994; Buchmeier and Heffron, 1991). Ein Impfstoff gegen GAS basierend auf Salmonellen wäre besonders für solche Entwicklungsländer geeignet, in denen GAS-Infektionen und die anschließenden, schweren Folgeerkrankungen ein schwerwiegendes Problem darstellen. Denn abgeschwächte

Lebendimpfstoffe sind gegenüber Impfstoffen, die auf Toxinuntereinheiten basieren von Vorteil, da zum einen der Technologietransfer, ebenso wie die administrative Logistik einfacher ist und da zum anderen die Produktions- und Transportkosten geringer ausfallen.

Obwohl eine Salmonelleninfektion in der Regel CD4⁺ T-Zellen stimuliert, konnten auch antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantworten gegen heterologe Proteine beobachtet werden (Nauciel, 1990; Pope *et al.*, 1994). Da über den Vektor *S. typhimurium* damit sowohl humorale Immunantworten als auch cytotoxische T-Zellantworten stimuliert werden können, ist ein Einsatz nicht nur zum Schutz vor extrazellulären Pathogenen, sondern auch vor viralen Infekten oder zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen möglich (Brown *et al.*, 1987; Dunstan *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999; Paglia *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses bakteriellen Vehikels auch Gendefekte aufgehoben werden können, indem das intakte Gen mittels *Salmonella* spp. in den Wirt eingebracht wird (4.2). Die Verwendung von Salmonellen als Transportsystem für SfbI könnte nicht nur einen Impfschutz vor Infektionen mit GAS hervorrufen, es stellt möglicherweise aufgrund der immunmodulatorischen Eigenschaften von SfbI außerdem ein Werkzeug dar, um Immunantworten gegen koexprimierte Antigene zu verstärken.

Frühere Studien von Hess *et al.* (1996) haben gezeigt, dass die Sekretion von Antigenen durch den intrazellulären Transporter im Gegensatz zur somatischen Expression einen effizienten Impfschutz hervorruft. Daher wurde das Hämolysin-Transportsystem von *E. coli* genutzt, um eine effiziente Expression und vor allem Sekretion des Proteins SfbI in Salmonellen zu erhalten. Ein mittels PCR amplifiziertes Fragment mit der kodierenden Sequenz für das SfbI-Derivat H12 wurde ohne Stopcodon über *Bam*HI/*Sal*I in den Vektor pTZ11b kloniert. In dem resultierenden Konstrukt steht das SfbI-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven β -Lactamase-Promotors (Abb.45). Es folgte die Klonierung des *Eco*RI/*Sal*I-Fragments in den Vektor pLG612-1B, wodurch ein Fusionsgen mit dem karboxyterminalen Ende des *hlyA*-Gens generiert wurde. Dieser Bereich enthält die Signalsequenz, welche für die Sekretion notwendig ist. Anschließend sollte das *Bgl*II-Fragment mit dem Promotor und dem Fusionsgen in den Vektor pVDL9.3 kloniert werden, um es mit den für den Export notwendigen Genen *hlyB* und *hlyD* zu kombinieren (Abb.45).

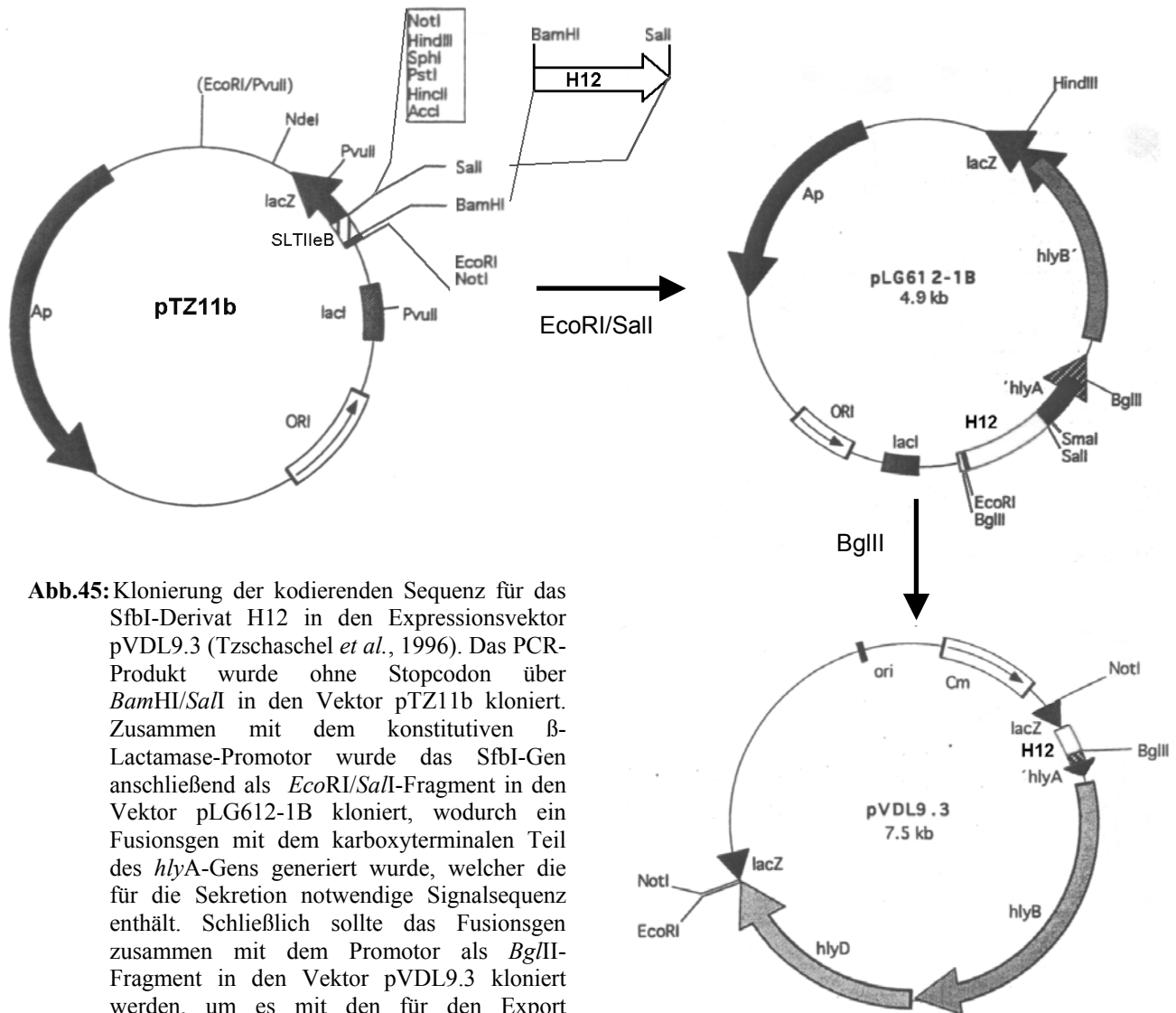


Abb.45: Klonierung der kodierenden Sequenz für das SfbI-Derivat H12 in den Expressionsvektor pVDL9.3 (Tzschaschel *et al.*, 1996). Das PCR-Produkt wurde ohne Stopcodon über *Bam*HI/*Sal*I in den Vektor pTZ11b kloniert. Zusammen mit dem konstitutiven β -Lactamase-Promotor wurde das SfbI-Gen anschließend als *Eco*RI/*Sal*I-Fragment in den Vektor pLG612-1B kloniert, wodurch ein Fusionsgen mit dem karboxyterminalen Teil des *hlyA*-Gens generiert wurde, welcher die für die Sekretion notwendige Signalsequenz enthält. Schließlich sollte das Fusionsgen zusammen mit dem Promotor als *Bgl*II-Fragment in den Vektor pVDL9.3 kloniert werden, um es mit den für den Export notwendigen Genen *hlyB* und *hlyD* zu kombinieren

Das Konstrukt sollte ferner die Möglichkeit bieten, das für das Antigen kodierende Gen in Verbindung mit den Genen *hlyA*, *hlyB* und *hlyD* über einen einzigen Klonierungsschritt als *Not*I-Fragment in Mini-Transposons zu integrieren, wodurch nach erfolgter Verabreichung die Integration in das Wirtschromosom erfolgen könnte (Tzschaschel *et al.* 1996).

Die Fertigstellung des Expressionsvektors, die Transformation in die *aroA*-Mutante *S. enterica* Serovar Thyphimurium SL7207 und die Charakterisierung der Expression und Sekretion der Fibronektin-Bindungsdomäne muss in weiteren Studien erfolgen.

4.2 Modulation der Immunantwort durch Koexpression von Cytokinen

Attenuierte *Salmonella* spp. Stämme sind in der Lage, Fremd-DNA (z.B. Plasmide) effektiv in Wirtszellen einzubringen, wo dann die Gene bei entsprechender Wahl eines eukaryontischen Promotors exprimiert werden. Anschließend folgt die Stimulierung einer Immunantwort durch das Genprodukt (Darji *et al.*, 1997; Sizemore *et al.*, 1995).

Mit Hilfe von Cytokinen, die in dem selben Impfstoff-Träger, in einem unabhängigen Träger oder von der Wirtszelle exprimiert werden, ist eine Manipulation der antigenspezifischen Immunantwort möglich. Cytokine sind Botenstoffe, die parakrin und auch autokrin wirken. Sie werden von Lymphocyten und Makrophagen gebildet und greifen regulatorisch in die Abwehrreaktion des Organismus ein (Tab.16). Das bedeutet, eine Immunantwort kann durch Cytokine gezielt in die Richtung gelenkt werden, die zur Abwehr eines Pathogens notwendig ist. So sind zirkulierende Antikörper effektiv bei der Neutralisierung extrazellulärer Bakterien und deren Exotoxinen, während einige Viren nur durch eine cytotoxische T-Zellantwort eliminiert werden können (Fairweather *et al.*, 1987; Taylor and Cohen, 1992). Für die effektive Bekämpfung intrazellulärer Bakterien oder Parasiten bedarf es wiederum der Aktivierung von Makrophagen (Iizawa and Czupurynski, 1992; Locksley and Louis, 1992).

Tab.16: Einige Cytokine und ihre Wirkungen

| Cytokin | produzierende Zelle | Wirkung |
|---------------|---|---|
| IL-2 | T-Zellen (Th1, einige CTL) | Proliferation der T-Zellen |
| IL-4 | T-Zellen (Th2), Mastzellen | B-Zell-Aktivierung, IgE-Wechsel |
| IL-5 | T-Zellen (Th2), Mastzellen | Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Zellen |
| IL-6 | T-Zellen, Makrophagen | Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Proteinproduktion der akuten Phase |
| IL-10 | T-Zellen (Th2), Makrophagen | Inhibitor von Makrophagenfunktionen |
| IL-12 | B-Zellen, Makrophagen | aktiviert NK-Zellen, induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu Th1-ähnlichen Zellen |
| TGF- β | Monocyten, T-Zellen (CD4+) | hemmt das Zellwachstum, entzündungshemmend |
| INF- γ | T-Zellen, natürliche Killerzellen (Th1, CTL) | Aktivierung der Makrophagen, erhöhte MHC-Expression |
| GM-CSF | Makrophagen, T-Zellen (Th1, einige Th2, einige CTL) | stimuliert Wachstum und Differenzierung der myelomonocytischen Linie |

Die Nutzung eukaryontischer Expressionsvektoren mit verschiedenen Cytokinen in Verbindung mit den SfbI exprimierenden Salmonellen würde eine Optimierung der stimulierten Immunantworten erlauben. Aus diesem Grund wurden für die Modulation der Immunantworten die Cytokine IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, TGF- β und INF- γ ausgewählt. Die Cytokine IL-2 und IL-5 wurden in den Expressionsvektor pBK-CMV (Stratagene) kloniert, IL-10, IL-12 und INF- γ in pcDNA3 (Invitrogen) und IL-12 und TGF- β wurden in den Vektor pCMV- β (Clontech) kloniert (Abb.46). Während der Vektor pBK-CMV sowohl einen pro- als auch einen eukaryontischen Promotor besitzt, enthalten pCMV- β und pcDNA3 lediglich einen eukaryontischen Promotor. Nach Sequenzierung der integrierten Fragmente zur Überprüfung des Leserasters wurden die Plasmide in die *aroA*-Mutante *S. enterica* Serovar Thyphimurium SL7207 transformiert.

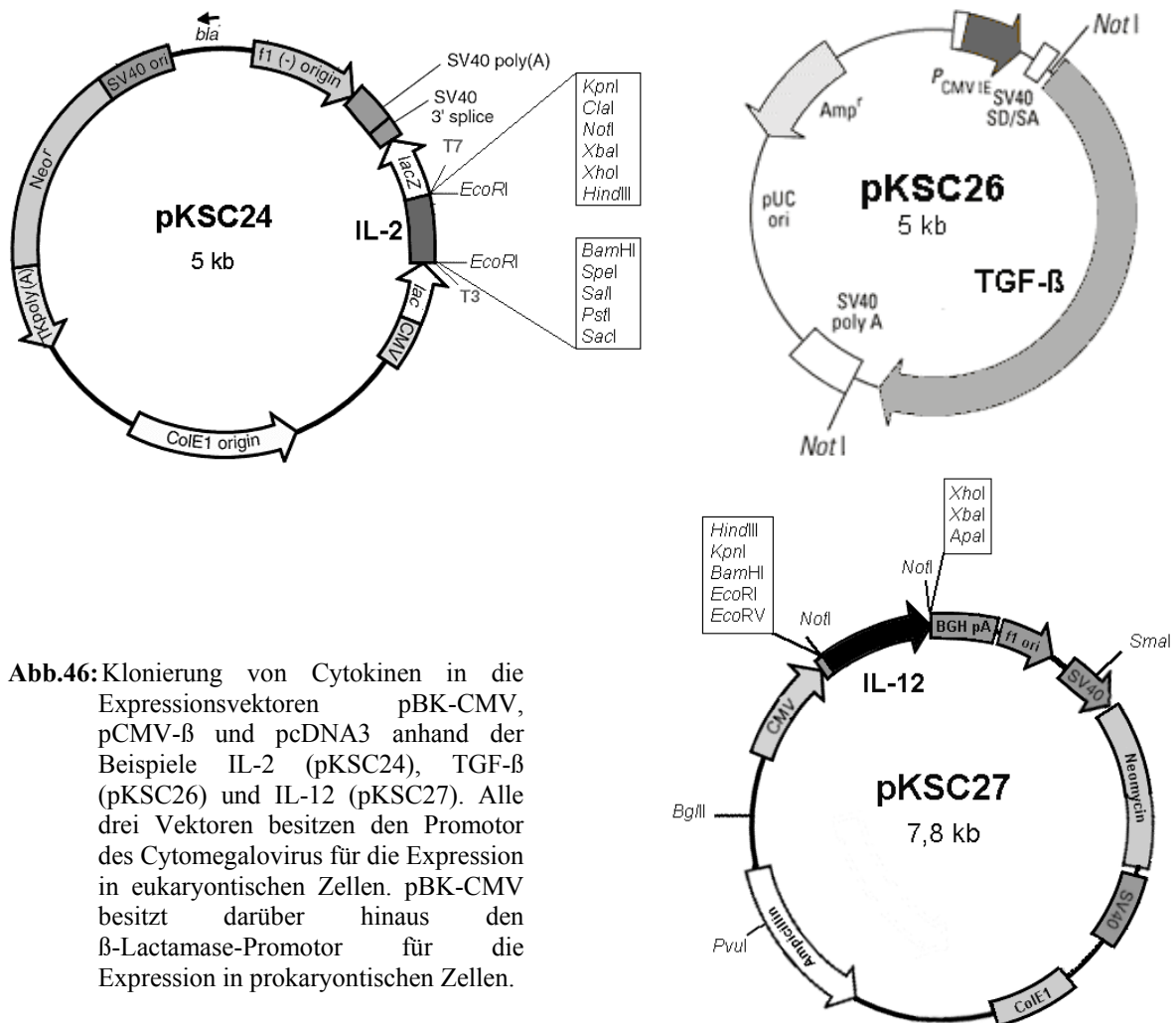


Abb.46: Klonierung von Cytokinen in die Expressionsvektoren pBK-CMV, pCMV-β und pcDNA3 anhand der Beispiele IL-2 (pKSC24), TGF-β (pKSC26) und IL-12 (pKSC27). Alle drei Vektoren besitzen den Promotor des Cytomegalovirus für die Expression in eukaryontischen Zellen. pBK-CMV besitzt darüber hinaus den β-Lactamase-Promotor für die Expression in prokaryontischen Zellen.

Die Effizienz der resultierenden Konstrukte wurde anhand eines Beispiels untersucht (in Kooperation mit P. Paglia). So konnte gezeigt werden, dass die Expression von INF-γ durch Makrophagen in INF-γ-*knock-out*-Mäusen durch Infektion der Makrophagen *in vitro* mit der *aroA*-Mutante *S. enterica* Serovar Thyphimurium SL7207, welche das murine Gen für INF-γ unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors auf dem Expressionsvektor pcDNA3 transportiert, wieder hergestellt werden konnte (Abb. 47 A). Überdies konnte durch die orale Immunisierung in diesen immunkomprimierten Tieren die natürliche Resistenz gegen bakterielle Infektionen wieder hergestellt werden (Abb. 47 B).

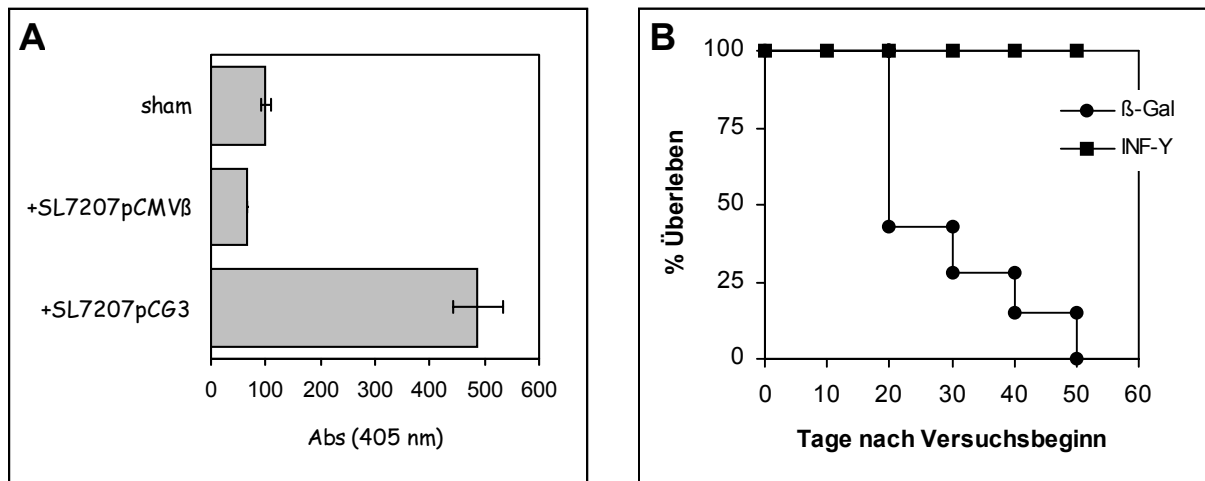


Abb.47: Korrektur des Gendefekts in INF- γ -defizienten Mäusen (GKO). (A) ELISA zur Detektion von INF- γ im Überstand von Makrophagen der *knock-out* Mäuse GKO, die mit Salmonellen infiziert wurden, welche entweder den β -Gal-Expressionsvektor pCMV β oder den INF- γ -Expressionsvektor trugen. Die Kontrolle (sham) wurde nicht infiziert. (B) Überlebensrate der infizierten GKO-Mäuse.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die generierten Konstrukte grundsätzlich immunmodulatorisch wirksam sind und dass mit attenuierten Bakterien als Impfstoffträger ein vielseitiges Werkzeug zur Verfügung steht. Weitere Studien müssen zeigen, inwieweit sich durch den Einsatz der Cytokine die Immunantworten zum Schutz gegen GAS-Infektionen optimieren lassen.

IV. Diskussion

1. Impfschutz vor *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes ist ein Humanpathogen, welches für Krankheiten wie Tonsillitis, Pharyngitis, Scharlach und Impetigo verantwortlich ist. Die eigentliche Gefahr besteht jedoch nicht in diesen lokalen Infektionen, sondern vielmehr in den weitaus gefährlicheren invasiven Streptokokkeninfektionen wie nekrotisierende Fasciitis und Toxischer-Schock-Syndrom, sowie den Folgeerkrankungen rheumatisches Fieber oder Glomerulonephritis. Von diesen Krankheiten betroffen sind nicht nur Entwicklungsländer mit schlechten Hygienebedingungen, sondern auch in den Industrieländern Europas und Amerikas stellen Gruppe A Streptokokken zunehmend eine Bedrohung dar. So hat sich gezeigt, dass trotz fehlender Resistenz die Behandlung von Mandelentzündungen mit Penicillin bei bis zu 35% der Patienten die Streptokokkeninfektion nicht beseitigen kann (Pichichero, 1998). Dies ist in sofern besorgniserregend, da die Sterblichkeitsrate der invasiven Infektionen mit 25% bzw. über 45% (*Centers of Disease Control and Prevention*) sehr hoch ist. Es besteht daher akuter Bedarf an einem Impfstoff gegen *S. pyogenes*.

Bisherige Versuche ein Vakzin zu entwickeln, konzentrierten sich lange auf das M Protein der Bakterien. Dieses Oberflächenprotein besitzt antiphagocytierende Aktivität und dient den Streptokokken zur Anheftung an die Epithelzellen. Obgleich M Proteine eine schützende Immunantwort stimulieren, stellten die Identifizierung von über 100 verschiedenen Serotypen und das Auftreten von Kreuzreaktionen der M-Protein-spezifischen Antikörper mit dem Wirtsprotein Myosin gravierende Probleme dar (Brandt *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 1993 und 1997; Dale *et al.*, 1985; Guilherme *et al.* 1995; Manjula *et al.*, 1985; Pruksakorn *et al.*, 1994). Die Identifizierung weiterer für einen Impfstoff geeigneter Streptokokkenantigene ist daher von großem Interesse.

Die Anheftung von *S. pyogenes* an Epithelien ist der Initialschritt der Infektion. Die Neutralisierung des Erregers direkt am Eintrittsort durch Blockierung der Adhäsion sollte daher den effektivsten Impfschutz liefern. Neben dem M Protein wurde ein weiteres Adhäsion identifiziert, das fibronectinbindende Protein SfbI (*S. pyogenes fibronectin-binding protein*). Über die Bindung an Fibronectin mittels SfbI sind die Streptokokken nicht nur in der Lage, sich an Epithelzellen anzuheften, sondern sie auch zu invadieren. Die Aufnahme der Bakterien wird dabei durch das integrin gebundene Fibronectin vermittelt (Cue *et al.*, 2000; Molinari *et al.*, 1997). Ferner gelingt es den Streptokokken, sich Abwehrmechanismen des Wirtes wie Phagozytose und antikörperabhängige, zellvermittelte Cytotoxizität zu entziehen, indem sie mittels SfbI die Fc-Komponente menschlicher Immunglobuline binden und so die Erkennung antigengebundener IgG durch Fc-Rezeptoren an der Oberfläche von Makrophagen und natürlichen Killerzellen verhindern (Medina *et al.*, 1999).

SfbI wird von über 73% einer großen Zahl verschiedener klinischer Isolate exprimiert, unabhängig von der Art der Infektion. Seine funktionale Domäne ist hoch konserviert und darüber hinaus wurden bisher keine Kreuzreaktionen mit Wirtsproteinen beobachtet (Talay *et al.*, 1994; Valentin-Weigand *et al.*, 1994). Schließlich hat sich gezeigt, dass die intranasale Immunisierung mit aufgereinigtem SfbI Mäuse vor einer Infektion mit einer letalen Dosis von *S. pyogenes* zu 80% schützen kann (Guzmán *et al.*, 1999). Zusammengefasst stellt das Fibronectin-Bindungsprotein I daher einen vielversprechenden Kandidaten für die

Generierung eines Impfstoffs gegen GAS-Infektionen dar. Wegen der enormen Instabilität von SfbI war allerdings Anlass zu Analysen gegeben, die den kleinstmöglichen Bereich von SfbI identifizieren würden, der noch eine schützende Immunantwort stimulieren kann.

1.1 Identifizierung und Charakterisierung des kleinsten, einen Impfschutz hervorrufenden Bereichs des Proteins SfbI

Um den Bereich des SfbI-Holoproteins einzuengen, der für die Induktion eines effektiven Impfschutzes notwendig ist, wurden intranasale Immunisierungen von Mäusen mit rekombinanten Proteinen durchgeführt, die jeweils verschiedene Regionen von SfbI umfassten. Während die Fragmente, welche die gesamte Fibronectin-Bindungsdomäne (H12) bzw. lediglich die fibronectinbindenden *Repeats* (H8) enthielten, den höchsten Impfschutz erzielten (80%), führte die Vakzinierung mit dem vollständigen Protein (H2) lediglich zu einem Schutz von 60%. Die Immunisierung mit dem rekombinanten Proteinfragment, welches die aromatische Domäne und den Bereich der prolinreichen *Repeats* umfasst (H10) und welchem somit die Fibronectin-Bindungsdomäne fehlt, führte bei einer Sterblichkeitsrate von 90% hingegen zu keinem Impfschutz.

Die Ursache für die Diskrepanz zwischen dem stimulierten Impfschutz durch die Fragmente H8 und H12 und dem vollständigen Proteinfragment H2 liegt möglicherweise in dem Ausmaß der Degradation des eingesetzten H2-Fragments begründet. So zeigten kleinere Fragmente eine deutlich geringere Zerfallsrate. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Immuninterferenz, bei der die Bereiche der aromatischen Domäne und der prolinreichen *Repeats* des H2-Fragments die Immunantwort gegen die Fibronectin-Bindungsdomäne beeinträchtigt haben. Immunantworten, bei denen eine Antigenkomponente des Vakzins die Immunantwort gegen eine andere Antigenkomponente hemmt oder sogar verhindert, wurden auch mehrfach bei polyvalenten Impfstoffen beobachtet (Dagan *et al.*, 1998; Minekawa *et al.*, 1974). Die zugrundeliegenden Mechanismen könnten z.B. die Konkurrenz um Antigenbindung und -präsentation durch B-Zellen sein oder die Überlagerung der Immunantwort gegen eine Impfstoffkomponente durch die einer anderen.

Alle Mäuse haben mit starken humoralen und zellulären Immunantworten auf die intranasale Immunisierung mit den verschiedenen rekombinanten Proteinfragmenten reagiert. Dass die Verabreichung des H12-Fragments trotz gleicher Molekülmengen geringere IgG-Titer im Serum hervorgebracht hat als H2 oder auch H10, beruht möglicherweise auf der unterschiedlichen Größe der Fragmente (H12: 24,3 kDa, H10: 40 kDa, H2: 61 kDa), wodurch die Anzahl der Antigen determinanten variieren kann. Darüber hinaus spielt möglicherweise der Einfluss der aromatischen Domäne (H10) auf die Sekundärstruktur der Proteine eine Rolle, da durch eine veränderte räumliche Struktur wiederum weniger Antigen determinanten zur Verfügung stehen können. Dies könnte auch die unterschiedlichen Muster der IgG-Subklassen von H2 und H10 erklären. Denn obwohl jeweils gleiche Molmengen der rekombinanten Proteine für die Immunisierungen eingesetzt wurden, zeigten das H2- und das H12-Fragment eine überwiegende IgG1-Antwort, während das H10-Fragment gleichermaßen IgG1 und IgG2a stimulierte. Die Immunisierung mit den Fragmenten, die die Fibronectin-Bindungsdomäne enthalten, stimulierte demnach eine Immunantwort, bei der überwiegend Th2-Helferzellen gegen das jeweilige Protein aktiv waren. Das Fragment ohne Fibronectin-Bindungsdomäne stimulierte hingegen sowohl Th1- als auch Th2-Helferzellen.

T-Zellen bilden und sezernieren Cytokine, die den Wechsel zu unterschiedlichen IgG-Isotypen induzieren (Stevens *et al.*, 1988). So wird bei der Maus von Th2-Helferzellen das Cytokin IL-4 gebildet, welches überwiegend den Wechsel zu IgG1 hervorruft, während das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ bevorzugt den Wechsel zu IgG2a und IgG3 induziert. Th1-Zellen sind bei der zellvermittelten Immunantwort für die Makrophagenaktivierung von großer Bedeutung, während Th2-Zellen die Antikörperproduktion fördern (Coffman *et al.*, 1991; London *et al.*, 1998; Romagnani, 1991; Street and Mosmann, 1991).

Bei der Stimulation antigenspezifischer IgA in den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes erwies sich die Fibronektin-Bindungsdomäne mit über 25% spezifischer IgA gegenüber etwa 12% (H2) und 14% (H10) am effektivsten. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Umfang des hervorgerufenen Impfschutzes durch die einzelnen rekombinanten Proteine. Denn IgA stellen in der Mukosa den wichtigsten Mechanismus zur Abwehr pathogener Mikroorganismen dar. Durch Blockierung des Adhäsins wird die Anheftung an die Epithelzellen verhindert und somit einer Kolonisierung der Bakterien in den oberen Atemwegen vorgebeugt.

Die stimulierten, zellulären Immunantworten gegen H2 und H12 waren statistisch signifikant stärker als die durch H10 hervorgerufenen Immunantworten. Dabei hat sich gezeigt, dass die Immunantworten gegen die Fragmente mit der Fibronektin-Bindungsdomäne auf lokaler Ebene wesentlich stärker ausgeprägt waren als auf systemischer Ebene. Für das Fragment H10 war hier kein Unterschied zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Impfschutz vor einer Infektion mit *S. pyogenes* durch die fibronektinbindenden *Repeats* stimuliert wird. Die intranasale Immunisierung induziert eine starke humorale Immunantwort auf mukosaler Ebene, die eine Neutralisierung des Krankheitserregers durch sekretorisches IgA zur Folge hat.

1.2 Stimulation eines immunologischen Gedächtnisses durch die Fibronektin-Bindungsdomäne

Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, d.h. die Fähigkeit des Immunsystems bei wiederholtem Kontakt mit einem Krankheitserreger schneller und effektiver auf diesen zu reagieren, stellt eine wichtige Funktion bei der adaptiven Immunantwort dar. Das immunologische Gedächtnis basiert auf antigenspezifischen Lymphocyten, die bei der Primärantwort neben den Effektorzellen gebildet werden und später bei einer sekundären Immunantwort zum Einsatz kommen. Ob es sich bei diesen Lymphocyten um langlebige Zellen handelt, die in ruhender Form im Körper zirkulieren oder ob es sich um bereits aktivierte Lymphocyten handelt, die durch persistierende Antigene immer wieder stimuliert werden ist noch ungeklärt (Ahmed and Gray, 1996).

Das B-Zell-Gedächtnis wird überdies durch persistierende, antigenspezifische Antikörper ergänzt, die für eine schützende Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind (Steinhoff *et al.*, 1995). Da die Halbwertszeit von Immunglobulinen aber verhältnismäßig kurz ist (IgG etwa 25 Tage), stellt sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen für die Persistenz der Antikörper. So gibt es die Vermutungen, dass die Antikörper von Plasmazellen produziert werden, die durch geringe Stimulation aus langlebigen Gedächtniszellen hervorgegangen sind (Schitteck and Rajewsky, 1990; Sprent and Tough, 1994) oder dass sie von langlebigen Plasmazellen generiert werden, welche im Knochenmark und der Milz

verweilen (Manz *et al.*, 1997; Slifka *et al.*, 1998). Eine andere Annahme geht davon aus, dass die Existenz persistierender Antikörper abhängig ist von ebenfalls persistierenden Antigenen. Diese Antigene sind dabei an follikuläre, dendritische Zellen in den Keimzentren gebunden und stimulieren so kontinuierlich die Differenzierung der B-Gedächtniszellen zu antikörperproduzierenden, relativ kurzlebigen Plasmazellen (Bachmann *et al.*, 1996).

Die Aktivität der B-Gedächtniszellen wird durch spezifische T-Gedächtniszellen verstärkt (Ahmed and Gray, 1996; Ochsenbein *et al.*, 2000). Während T-Gedächtniszellen für die Kontrolle systemischer Infektionen ausreichend Zeit haben, zu expandieren und zu Effektorzellen zu differenzieren, scheint dies jedoch in der Mukosa eher kritisch zu sein. Hier bedarf es möglicherweise T-Effektorzellen, um eine erneute Erkrankung zu verhindern. Denn da die Pathogene direkt am Eintrittsort replizieren und Gewebsschädigungen verursachen können, wäre der Schaden wahrscheinlich schon entstanden bevor die Gedächtniszellen zu Effektorzellen reifen könnten (Ahmed and Gray, 1996). Da aktivierte T-Lymphocyten aber relativ kurzlebig sind, ist möglicherweise auch das T-Zellgedächtnis abhängig von persistierenden Antigenfragmenten, die permanent die Differenzierung der Gedächtniszellen zu Effektorzellen stimulieren (Sprent, 1994, Sprent and Tough, 1994). Sicher ist, dass die Existenz eines Gedächtnisses dem Individuum ermöglicht, einen neuerlichen Kontakt mit einem Pathogen deutlich schneller und meist ohne erneuter Erkrankung zu überstehen. Ein idealer Impfstoff sollte daher einen möglichst lebenslangen Schutz bieten.

Aus diesem Grund wurde untersucht, in welchem Umfang durch die Immunisierung mit der Fibronectin-Bindungsdomäne (H12-Fragment) eine schützende Immunantwort, d.h. ein immunologisches Gedächtnis stimuliert werden kann. Zu diesem Zweck wurden die immunisierten Mäuse für drei Monate belassen und schließlich mit einer letalen Dosis von *S. pyogenes* infiziert. Es hat sich gezeigt, dass die Tiere trotz drastischer Abnahme der für den Impfschutz essentiellen antigenspezifischen IgA in der Schleimhaut der oberen Atemwege vor einer Streptokokkeninfektion geschützt waren. So betrug der Anteil antigenspezifischer IgA in den Lungen der Mäuse zehn Tage nach der Immunisierung etwa 14%, in denen drei Monate nach der Immunisierung lediglich noch etwa 1%. Da dennoch in beiden Gruppen jeweils ein Impfschutz von 80% erzielt wurde ist davon auszugehen, dass der Impfschutz der drei Monate alten Gruppe auf der Ausbildung eines Gedächtnisses beruht. Ob dieses in Form „echter“, langlebiger B-Gedächtniszellen vorliegt oder vielmehr durch langlebige Plasmazellen repräsentiert wird ist ungewiss. Einerseits hat sich gezeigt, dass sich, obwohl die Lebensspanne der Plasmazellen in der Mukosa im Gegensatz zum Knochenmark deutlich geringer ist, eine Antikörperantwort in der Schleimhaut dennoch über mehrere Monate erstrecken kann (Ahmed and Gray, 1996). Andererseits gibt es Studien, die kein antigenunabhängiges, auf persistierende Antikörper basierendes Gedächtnis feststellen konnten und vielmehr die Annahme der antigenstimulierten und T-Zell-abhängigen Differenzierung der B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen unterstützen (Ochsenbein *et al.*, 2000). Hierfür würde auch die Beobachtung sprechen, dass durch die Vakzinierung mit der Fibronectin-Bindungsdomäne ebenfalls ein auf Th2-Zellen basierendes Gedächtnis stimuliert wurde. So konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den zellulären Immunantworten der drei Monate alten Gruppe und der Kontrollgruppe (25 Tage) beobachtet werden.

Wie auch immer die Komponenten des stimulierten immunologischen Gedächtnisses im einzelnen beschaffen sein mögen, entscheidend ist letztlich, dass durch die Immunisierung mit der Fibronektin-Bindungsdomäne ein langanhaltender Impfschutz vor einer Infektion mit *S. pyogenes* hervorgerufen werden konnte.

1.3 Durch die Fibronektin-Bindungsdomäne induzierter Impfschutz vor *S. pyogenes* ohne Koadministration eines mukosalen Adjuvans

Streptokokken und die meisten anderen Pathogene dringen über die Mukosa in den Wirt ein. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass durch Impfung eine lokale Immunantwort zur Prävention von Infektion und Etablierung einer Krankheit stimuliert wird. Die mukosale Vakzinierung mit Antigenen auf der Basis löslicher Proteine ist jedoch gewöhnlich problematisch, da diese häufig nur schwach immunogen sind. Die Folge ist die Ausbildung einer Toleranz gegenüber dem Antigen. Um dieses Problem zu umgehen, können Antigene zusammen mit Adjuvantien verabreicht werden. Adjuvantien sind Substanzen, welche unspezifisch die gegen das Antigen gerichtete Immunantwort verstärken und so die Toleranz verhindern. Bisher stehen jedoch nur wenige solcher Adjuvantien zur Verfügung. Das im Tiermodell als mukosales Adjuvans eingesetzte CTB ist sehr gebräuchlich und wurde auch bei den Immunisierungsstudien dieser Arbeit verwendet. Die Wirkungsweise von CTB ist allerdings umstritten. Einerseits wurde die Adjuvansaktivität Resten des Holotoxins zugeschrieben, welche bei der Aufreinigung von CTB nicht vollständig entfernt wurden (Lycke and Holmgren, 1986; Spiegel, 1990), andererseits gibt es Studien, die zeigen, dass reines, rekombinantes CTB durchaus Adjuvansaktivität besitzt, wenn auch in geringerer Form als das Holotoxin (Bergquist *et al.*, 1997; De Geus *et al.*, 1997; Isaka *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998; Li and Fox, 1996). Dabei hat sich gezeigt, dass der Wirkungsgrad stark von dem Weg abhängt, über welchen CTB verabreicht wird. Während bei oraler Verabreichung keine Adjuvanseigenschaft beobachtet werden konnte (Agren *et al.*, 1997; Blanchard *et al.*, 1998), scheint CTB bei intranasaler Immunisierung die Immunantwort verstärken zu können (Bergquist *et al.*, 1997; Wu and Russell, 1998).

Als zugrunde liegender Mechanismus wurde die Möglichkeit diskutiert, dass CTB durch die Bindung an antigenpräsentierende Zellen direkt die Produktion des Cytokins IL-4 durch Th2-Zellen kostimuliert (Li and Fox, 1996). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass CTB darüber hinaus in der Lage ist, den TGF- β 1 vermittelten Isotypenwechsel von B-Lymphocyten zu IgA zu stimulieren (Kim *et al.*, 1998).

Der Einsatz von CTB oder auch des Holotoxins als mukosales Adjuvans bei Impfungen von Menschen scheint jedoch nicht möglich. Auf der einen Seite verhindert die starke Toxizität des Holotoxins dessen Nutzung und auf der anderen Seite herrscht Unklarheit über die Effizienz des nicht toxischen CTB's. Darüber hinaus scheint der Einsatz von CTB selbst bei erwiesener Effizienz noch fraglich zu sein. Denn wie für das genetisch inaktivierte, hitzelabile Toxin (LT) von *E. coli* gezeigt werden konnte, führt die intranasale Immunisierung nicht nur zu einer Veränderung der Mukosa, sondern das Toxin gelangt darüber hinaus einhergehend mit einer entzündlichen Reaktion über die Hirnhaut in das Gehirn und zum Zentralnervensystem (N. Garcon, Präsentation auf dem World Vaccine Congress, Geneva, 26-28 September 1999).

Aus diesem Grund und da bereits gezeigt werden konnte, dass auch SfbI über Adjuvanseigenschaften sowohl auf systemischer als auch auf mukosaler Ebene verfügt (Medina *et al.* 1998), wurde untersucht, ob die Koadministration von CTB für die Stimulation einer schützenden Immunantwort gegen *S. pyogenes* durch die Fibronectin-Bindungsdomäne essentiell ist.

Es hat sich gezeigt, dass sich die hervorgerufenen Immunantworten in keiner Weise unterschieden. Der Verzicht auf CTB hatte weder einen Einfluss auf die Kinetik und das Ausmaß der Antikörperbildung, noch wurde eine andere T-Helferzellen Subpopulation stimuliert, noch gab es Auswirkungen auf die lokale, mukosale Immunantwort. Sowohl mit als auch ohne CTB betrug der Anteil antigenspezifischer IgA nach der intranasalen Immunisierung etwa 25% und wurde auf systemischer Ebene vorwiegend eine IgG1-Antwort, d.h. eine Th2-Antwort stimuliert. Ferner gab es keinen signifikanten Unterschied bei der Stimulation der zellulären Immunantwort.

Es wundert daher nicht, dass es für die Stimulierung einer schützenden Immunantwort keines CTB bedarf. Nicht nur, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem stimulierten Impfschutz mit (80%) und ohne (70%) CTB gab, darüber hinaus bestand dieser Impfschutz auch noch drei Monate nach der Immunisierung.

Die Möglichkeit auch ohne Koadministration eines mukosalen Adjuvans eine schützende Immunantwort gegen *S. pyogenes* hervorrufen zu können, ist von großem Vorteil für die Formulierung eines potentiellen Impfstoffes. Zum einen lässt sich dadurch das Problem möglicher Nebeneffekte durch das Adjuvans umgehen, zum anderen wird der Umfang sowohl der Herstellung als auch der Kosten reduziert.

Da SfbI selbst über Adjuvanseigenschaften verfügt wäre auch der Einsatz in Multikomponenten-Impfstoffen denkbar. So ließe sich gleichzeitig die Immunantwort gegen koadministrierte, potentielle Antigene verstärken und ein Impfschutz gegen GAS erzielen.

2. Identifizierung von B- und T-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsdomäne des Proteins SfbI

Neuere Ansätze zur Entwicklung von Impfstoffen befassen sich mit dem Einsatz synthetischer Oligopeptide, welche B- oder T-Zellepitope oder aber auch beide Typen enthalten können. Das Konzept beruht zunächst auf der Identifizierung solcher Epitope innerhalb des Antigens. Es folgt die Synthese der entsprechenden Sequenzen und schließlich die Formulierung des Impfstoffes. So basierten z.B. erste Versuche zur Stimulierung humoraler Immunantworten auf Peptide, welche B-Zellepitope enthielten (Brown, 1990).

Die Vorteile solcher auf Peptide beruhenden Vakzine sind vielschichtig. Zum einen sind sie chemisch stabil, sie lassen sich leicht sterilisieren und können gefriergetrocknet gelagert werden. Zum anderen ermöglicht die Wahl der Epitope den Ausschluss potentieller, kreuzreaktiver Bereiche und es lassen sich Peptide mit unterschiedlichen Eigenschaften, wie eben B- und T-Zellepitope, miteinander verbinden (Ada and Ramsay, 1997; Brandt, *et al.*, 2000; Pruksakorn *et al.*, 1992).

Ein gravierender Nachteil besteht jedoch in der geringen Immunogenität der Peptide. Um dieses Problem zu überwinden, können die Peptide entweder zusammen mit depotformenden Adjuvantien (z.B. incomplete Freund's adjuvant; Olsen *et al.*, 2000; Vordermeier *et al.*, 1995) oder bakteriellen Toxinen (z.B. CTB oder LT; Bessen and Fischetti, 1988; Simmons *et al.*,

2001) verabreicht werden. Ferner gibt es die Möglichkeiten, multiple Peptide zu generieren, die aus mehreren, hintereinander gereihten Kopien eines Epitops bestehen (Nardin *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1991).

Im Falle von SfbI ließen sich durch die Synthese rekombinanter Peptide die Probleme der Instabilität bei der Aufreinigung und Lagerung des Proteins umgehen. Da für einen effektiven Impfschutz vor *S. pyogenes* vor allem neutralisierende Antikörper notwendig sind und in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der Impfschutz durch die hoch konservierte Fibronektin-Bindungsdomäne hervorgerufen wird, wurden die Antigen determinanten und die T-Zellepitope innerhalb der fibronektinbindenden *Repeats* identifiziert. Dies geschah darüber hinaus neben dem Inzucht-Mausstamm BALB/c auch für die congenen Stämme BALB/b und BALB/k, deren Genom sich von dem des BALB/c lediglich um einen einzigen Locus, dem MHC-Locus (Haupthistokompatibilitätskomplex), unterscheidet.

Die Versuche haben ergeben, dass von BALB/c zwei lineare Antigen determinanten in den Sequenzbereichen MGGQSESVEFTK und GMSGQTTPQVET erkannt werden, wohingegen sowohl von BALB/b als auch von BALB/k lediglich ein lineares B-Zellepitop in dem Sequenzbereich EDTKEPGVLMGG erkannt wird. Dieser Bereich befindet sich jeweils zu Beginn der *Repeats*, während die Sequenz MGGQSESVEFTK etwa in der Mitte der *Repeats* lokalisiert ist. Der Bereich GMSGQTTPQVET hingegen befindet sich im Übergang von *Repeat* 1 zu *Repeat* 2 bzw. von *Repeat* 3 zu *Repeat* 4. Zwischen den *Repeats* 2 und 3 ist diese Sequenz aufgrund einer Abweichung in der Aminosäuresequenz nicht zu finden.

Die unterschiedlichen B-Zellepitope der congenen Mausstämmen zeigen, dass ein potentieller, auf Peptiden basierender Impfstoff gegen *S. pyogenes* eine Kombination mehrerer Epitope enthalten muss. Ob die Menge der benötigten Peptide gegebenenfalls noch größer ausfällt oder ob gar andere Peptide notwendig sind, muss in zukünftigen Studien durch die Identifizierung der Antigen determinanten menschlicher Haplotypen geklärt werden.

Ebenso bedarf es der weiteren Klärung, ob und in welchem Umfang sich die T-Zellepitope der congenen Mausstämmen BALB/b und BALB/k, sowie anderer H2-Haplotypen von dem der BALB/c-Mäuse unterscheiden. Die in dieser Arbeit identifizierte, das Epitop enthaltende Region DTQTGMSGQTTPQVETEDTKEPGV befindet sich im Übergang der *Repeats* 1 und 2, sowie 3 und 4 und enthält neben dem linearen B-Zellepitop GMSGQTTPQVET (BALB/c) auch einen Großteil der Antigen determinante EDTKEPGVLMGG (BALB/b und BALB/k). Ferner wurde mittels des Algorithmus' SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) die Möglichkeit verschiedener MHCII-Motive für den menschlichen Haplotyp HLA-DRB1 in dieser Region vorhergesagt.

Ein Impfstoff basierend auf diesem Polypeptid erscheint daher vielversprechend. Es bleibt allerdings zu untersuchen, ob eine Immunisierung tatsächlich sowohl B- als auch T-Lymphocyten stimulieren und so eine schützende Immunantwort hervorrufen kann. Faktoren wie konformationelle Unterschiede zwischen dem Protein und der Peptide können ebenso Einfluss nehmen, wie die Kombination der Peptide. So wurde beobachtet, dass die Immunisierung mit einem Dipeptid, bestehend aus einem B- und einem T-Zellepitop, die Produktion antigenspezifischer Antikörper stimulieren kann, während ein Gemisch aus den beiden Epitopen keine Antikörperantwort induziert (Brumeanu *et al.*, 1997). Ferner kann auch die Reihenfolge der Epitope ausschlaggebend sein (Cox *et al.*, 1988, Parditos *et al.*, 1992) und ob sich B- und T-Zellepitope überlappen (Fitzmaurice *et al.*, 1996).

Auch wenn bisher noch kein lizenziertes Peptid-Vakzin existiert, so wurde doch bereits erfolgreich in einigen klinischen Studien der Phase III gegen Malaria geimpft (Alonso *et al.*, 1994; Valero *et al.*, 1993). Allerdings ist auch hier der Erfolg begrenzt, so dass auf Peptide basierende Vakzine möglicherweise eher als weiteres Werkzeug zu verstehen sind, welches die Auswahl an Impfstoffen zur individuellen Bekämpfung der vielseitigen Pathogene vergrößert.

3. Fibronektin-Bindungsdomäne des Proteins SfbI als mukosales Adjuvans

Wie bereits erwähnt, stellen Adjuvantien bei Impfungen ein wirkungsvolles Mittel zur Potenzierung schwachverlaufender Immunantworten dar. Die Eigenschaft beruht auf der spezifischen oder auch unspezifischen Erhöhung der Immunogenität des Antigens, obgleich die zugrunde liegenden Mechanismen der einzelnen Adjuvantien verschieden sind. Man unterscheidet Adjuvantien, die die Persistenz des Antigens fördern und eine kontrollierte Freisetzung ermöglichen (z.B. Emulsionen aus Wasser und Öl, Aluminiumsalze), Adjuvantien, die die Bindung des Antigens an und die Präsentation gegenüber Effektorzellen durch antigenpräsentierende Zellen fördern (z.B. Lipid A, Liposomen, Saponine, CTB) und Adjuvantien, die per se eine Immunantwort stimulieren (z.B. Muramyl-dipeptid, abgetötete Mycobakterien oder Bordetellen) (Ada and Ramsay, 1997; Cox and Coulter, 1997; Vogel, 2000). Es ist gelungen, eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Substanzen mit Adjuvanseigenschaften zu identifizieren, von denen einige auch bereits in klinischen Studien getestet werden. Für den routinemäßigen Einsatz beim Menschen jedoch stellen Aluminiumsalze bisher das einzige und sicherste Adjuvans dar. Aber nicht nur aus diesem Grund ist die Identifizierung neuer Adjuvantien von großer Bedeutung. Der Einsatz von Aluminiumsalzen induziert starke, antigenspezifische Th2- aber nur moderate, zellvermittelte Immunantworten. Eine größere Auswahl verschiedener Adjuvantien böte die Möglichkeit, Immunantworten gezielt auf das Antigen abzustimmen. So werden z.B. durch immunstimulatorische Komplexe (ISCOM) starke Th1- und Th2-Immunantworten, sowie CTL induziert, Lipid A hingegen stimuliert lediglich starke Th1-Antworten, Wasser-Öl-Emulsionen induzieren gute Antikörperantworten, Cytokine können je nach Wahl Th1- oder Th2-Immunantworten fördern und bakterielle Toxine wie CTB induzieren als mukosales Adjuvans IgA-Antworten (Cox and Coulter, 1997; Vogel, 2000).

Neben CTB wurden bisher noch zwei weitere bakterielle Toxine als mukosale Adjuvantien beschrieben (Douce *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1995), deren Toxizität durch genetische Veränderung überwunden zu sein scheint (Del Giudice and Rappuoli, 1999; Douce *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1997).

Dennoch ist die Identifizierung weiterer mukosaler Adjuvantien mit verschiedenen biologischen Eigenschaften auch weiterhin von Nutzen, um die Qualität der induzierten Immunantworten individuell noch besser abstimmen zu können. Frühere Studien zur Charakterisierung der Immunantworten gegen SfbI haben ergeben, dass die intranasale Immunisierung von Mäusen sowohl eine starke humorale als auch mukosale Antikörperantwort stimulieren. Daher wurde in weiteren Versuche das Potential von SfbI, als mukosales Adjuvans zu wirken, näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die chemische Koppelung von SfbI an das Modellantigen Ova nicht nur die mukosale, sondern

auch die humorale und zelluläre Immunantwort gegen Ova wesentlich verstärken konnte (Medina *et al.*, 1998). So wurde die Bildung sekretorischer IgA induziert, der stimulierte IgG-Titer im Serum wurde etwa um das Hundertfache verstärkt und neben Th2-Zellen wurden außerdem antigenspezifische CTL stimuliert.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich die Aufreinigung und Handhabung des gesamten Proteins SfbI aufgrund seiner Instabilität sehr schwierig gestaltet. Ferner ist die Generierung chimärer Proteine mit einem erhöhten Aufwand, einhergehend mit erhöhten Kosten bei der Herstellung eines Impfstoffes verbunden. So müssen zunächst zwei Proteine aufgereinigt werden, diese dann je nach gewählter Methode durch bestimmte Aminosäuren aneinander gekoppelt werden und schließlich müssen nach dem Prozess der Kopplung die benötigten, meist toxischen Chemikalien wieder von dem Impfstoff getrennt werden. Darüber hinaus ist die Auswahl der Antigene bei der chemischen Kopplung möglicherweise durch die begrenzte Anzahl verwendbarer Aminosäuren beschränkt.

Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob an Stelle der chemischen Kopplung die Fusion des Modellantigens mit dem Adjuvans die gleiche Effizienz erbringt und ob für die Adjuvanseigenschaft das vollständige SfbI notwendig ist. Weder die Immunisierung mit dem Fusionsprotein bestehend aus Ova und Gesamt-SfbI noch die Immunisierung mit den aus Ova und der aromatischen Domäne bzw. der Fibronectin-Bindungsdomäne bestehenden Fusionsproteinen hatte eine Potenzierung der antigenspezifischen Immunantworten zur Folge. Während die humorale Immunantwort lediglich um das Vierfache gesteigert wurde, war auf zellulärer Ebene keinerlei Effekt zu beobachten. Ebenso wurde keine mukosale Immunantwort gegen Ova stimuliert. Diese Ergebnisse standen im starken Widerspruch zu den Beobachtungen von Medina *et al.* 1998. Eine Ursache für die mangelnde Stimulierung antigenspezifischer Immunantworten könnte auf eine Instabilität der Fusionsproteine zurückzuführen sein. So waren bei Western-Blot Analysen der aufgereinigten Fusionsproteine niemals nur eine distinkte Bande zu erkennen. Darüber hinaus könnte die Fusion des Modellantigens Ova mit SfbI trotz Verwendung eines *Linkers* eine Veränderung der Sekundärstruktur eines oder beider Teilproteine zur Folge gehabt haben. Dadurch könnte beispielsweise eine sterische Hinderung durch Ova die Bindungseigenschaften von SfbI außer Kraft setzen, wodurch die Bindung an antigenpräsentierende Zellen verhindert werden würde. Ferner wäre eine Zerstörung konformationeller Antigen determinanten denkbar, so dass eine Bindung an Oberflächenimmunglobuline der B-Lymphocyten ausbliebe.

Darauffolgende Vakzinierungen erfolgten daher nicht unter Verwendung von Fusionsproteinen, sondern Modellantigen und potentiell Adjuvans wurden koadministriert. Schließlich wurde an Stelle des Ovalbumins β -Galaktosidase eingesetzt, da bei Wiederholungsversuchen mit Ova darüber hinaus Probleme bei der Stimulation der T-Zellproliferation auftraten.

Im Gegensatz zu den Immunisierungen mit Ova wurde nun nicht nur die humorale, sondern auch die mukosale Immunantwort deutlich verstärkt. So waren die IgG-Titer eine Woche nach der dritten Immunisierung bei Koadministration mit dem Derivat H12 16 mal, bei H10 etwa 60 mal und bei dem Derivat H2 sogar ca. 100 mal höher als bei Vakzinierung mit β -Gal allein. Des weiteren verlief die Kinetik der Antikörperproduktion in Gegenwart des Adjuvans deutlich schneller. So wurden bei allen SfbI-Derivaten bereits nach der zweiten Immunisierung hohe, β -Gal-spezifische IgG-Titer detektiert, während die Antikörperbildung

bei β -Gal allein unterhalb der Nachweisgrenze lag. Schließlich wurde sowohl durch die SfbI-Derivate, welche die Fibronectin-Bindungsdomäne enthalten, als auch durch das Derivat, welchem diese Domäne fehlt, die $CD4^+$ -T-Zellantwort verstärkt in Richtung Th2-Antwort gelenkt. Eben solche, die für eine effiziente Neutralisierung des Pathogens durch Antikörper notwendig ist.

Die wichtigste Funktion eines mukosalen Adjuvans besteht allerdings hauptsächlich darin, die Bildung antigenspezifischer sIgA zu stimulieren, so dass bereits direkt am Eintrittsort in den Wirt die Festsetzung eines Pathogens und damit die Kolonisierung der Schleimhaut verhindert werden kann. Wie sich gezeigt hat, ist nicht nur das vollständige SfbI dazu in der Lage, sondern auch die beiden Derivate bestehend aus aromatischer Domäne und prolinreichen *Repeats* bzw. Fibronectin-Bindungsdomäne verstärken die β -Gal-spezifische sIgA-Antwort um das bis zu Siebenfache.

Die Adjuvansaktivität von SfbI scheint sich jedoch auf die mukosale und humorale Immunantwort zu beschränken. Denn wie bereits bei den Versuchen mit Ova als Modellantigen, wurde auch in diesem Fall die zelluläre Immunantwort nicht signifikant verstärkt. Das aber trotz fehlender T-Zell-Antwort dennoch eine verstärkte humorale Immunantwort gegen β -Gal induziert wurde, liegt wahrscheinlich in der Fähigkeit begründet, B-Zellen unspezifisch über die fibronectinbindende Domäne aktivieren zu können. Durch β -Gal nur unzureichend aktivierte B-Zellen werden hierbei möglicherweise durch das koadminierte SfbI unspezifisch stimuliert, wodurch es zur klonalen Expansion und vermehrten Expression von MHC II-Molekülen kommt (Medina *et al.*, 1998). In ähnlicher Form könnte auch ein Bereich der aromatischen Domäne oder der prolinreichen *Repeats* in dem SfbI-Derivat H10 wirken. So liefert diese Region möglicherweise ein kostimulierendes Signal oder ist ebenfalls in der Lage die oberflächengebundenen Immunglobuline miteinander zu vernetzen, wodurch wiederum die klonale Expansion induziert werden würde.

Es hat sich gezeigt, dass die Fibronectin-Bindungsdomäne, aber auch der N-terminale Bereich mit aromatischer Domäne und den prolinreichen *Repeats* von SfbI als Adjuvans wirken kann. Beide Regionen scheinen mitogene Eigenschaften zu besitzen und B-Zellantworten zu fördern. Weiterhin ließ sich beobachten, dass für die Adjuvansaktivität weder eine Kopplung noch eine Fusion von Antigen und Adjuvans nötig war, so dass eine einfache Kombination verschiedener Antigene mit dem Adjuvans möglich ist. Es bleibt zu untersuchen, ob die Adjuvanseigenschaft von SfbI bzw. dessen Derivate ausreicht, um schützende Immunantworten stimulieren zu können. Zu diesem Zweck könnte an Stelle von β -Gal z.B. ein impfstoffrelevantes Antigen eingesetzt und die Effizienz in Infektionsstudien untersucht werden.

4. Entwicklung eines auf Salmonellen basierenden Impfstoffkandidaten gegen *S. pyogenes*

Salmonellen haben sich als exzellente Transportsysteme für Fremd- und Tumorantigene erwiesen (Verma, *et al.*, 1995, Dunne *et al.*, 1995, Nardelli-Haeffliger *et al.*, 1997, Karem *et al.*, 1997, Chacon *et al.*, 1996, Schorr *et al.*, 1991, Medina *et al.*, 1999), da sie sowohl $CD4^+$ T-Zellen stimulieren, als auch antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellantworten gegen heterologe Proteine induzieren können (Nauciel, 1990; Pope *et al.*, 1994). Das potentielle Impfstoff-Antigen kann an der Zelloberfläche des bakteriellen Transporters exponiert werden, es kann

im Cytoplasma verbleiben oder es kann in die Umgebung sekretiert werden. Jedoch scheint die Sekretion des Antigens die Effizienz gegenüber somatisch exponierter Antigene zu steigern (Hess *et al.*, 1993). So wurde ein auf dem Hämolysin-Sekretionsapparat von *E. coli* basierendes System entwickelt, welches die aktive Sekretion fusionierter Antigene erlaubt und somit die Immunantwort verbessert (Su *et al.*, 1992, Tzschaschel *et al.*, 1996). Zukünftige Versuche mit dem Expressions- und Sekretionsvektor, welcher das Gen für ein chimäres Protein bestehend aus der Fibronektin-Bindungsdomäne von SfbI und dem Hämolysin A trägt, müssen zeigen, ob durch orale Immunisierung mit *Salmonella* spp. ein Impfschutz vor *S. pyogenes* erzielt werden kann, welche Immunantworten induziert werden und ob gegebenenfalls eine Optimierung durch Modulation mittels koexprimierter Cytokine erfolgen muss.

5. Koexpression von Cytokinen bei der Immunisierung zur Modulation der Immunantwort

Jüngste Entwicklungen auf dem Gebiet der Impfstoffforschung beschäftigen sich mit der Verwendung von DNA-Molekülen als Vakzine. Hierbei wird die für ein bestimmtes Antigen kodierende DNA in eukaryontische Zellen eingebracht, in denen das Antigen daraufhin synthetisiert wird. Anschließend erfolgt durch das Genprodukt die Stimulation einer Immunantwort. Das Einbringen der DNA kann zum einen auf die Art geschehen, dass „nackte“ DNA in Form eines Expressionsvektor verabreicht wird (Donnelly *et al.*, 1997), zum anderen kann man sich eines viralen oder bakteriellen Transporters bedienen, um die DNA in den Organismus einzubringen (Darji *et al.*, 1997 und 2000). In jedem Fall bietet die DNA-Vakzinierung ein breites Spektrum an Möglichkeiten, die passende Immunantwort gegen das ausgewählte Antigen hervorzurufen. So lassen sich je nach Anwendung des Impfstoffes entweder systemische oder mukosale Immunantworten stimulieren. Die Effizienz kann gesteigert werden, indem z.B. durch Einfügen bestimmter Sequenzen die Prozessierung des Antigens optimiert wird. Ferner besteht die Möglichkeit, gleichzeitig über den selben oder über einen zweiten Vektor Gene für immunmodulatorische Moleküle wie z.B. Cytokine einzubringen.

Für die Immunisierung mit „nackter“ DNA bedarf es jedoch großer Mengen und dennoch scheint die Stimulation von Immunantworten ineffizient zu sein (Lai and Bennett, 1998). Durch die Verwendung mikrobieller Transporter steht dagegen ein System zur Verfügung, welches den Transport des Antigens direkt an die immuninduktiven Orte erlaubt und zudem auf einfachem Wege die Amplifizierung des Antigens ermöglicht. Man unterscheidet bakterielle und virale Transportsysteme, welche auf attenuierten Krankheitserregern basieren. Bakterien scheinen dabei gegenüber den viralen Systemen von Vorteil zu sein. So besitzen Viren häufig immundominante Epitope, die mit denen der rekombinanten Antigene konkurrieren können, die Menge fremder DNA, die in bakterielle Plasmide kloniert werden kann ist deutlich größer als die Menge, welche Viren aufnehmen können und nicht zu letzt können Bakterien durch Antibiotika besser kontrolliert werden. Ferner konnte unter Verwendung des in dieser Arbeit entstanden INF- γ -Expressionsvektors gezeigt werden, dass sich über die Salmonellen auch Gendefekte beheben lassen. So führte die Infektion INF- γ -defizienter Makrophagen mit Salmonellen, welche diesen Vektor transportieren und INF- γ exprimieren nicht nur zur Wiederherstellung der Produktion dieses Cytokins, sondern auch

zur Wiedereinführung der natürlichen Resistenz gegenüber bakterieller Infektionen (Paglia *et al.* 2000).

6. Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse haben die Identifizierung der kleinsten Region des Proteins SfbI, welche zur Stimulation einer protektiven Immunantwort gegen Infektionen mit GAS benötigt wird, ermöglicht. Ferner konnten innerhalb dieser Region lineare B-Zellepitope und ein T-Zellepitop identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass SfbI bzw. dessen Fibronectin-Bindungsdomäne nicht nur die Ausbildung eines effektiven, immunologischen Gedächtnisses stimulieren kann, sondern dass die Immunantworten aufgrund der immunmodulatorischen Eigenschaften des Proteins darüber hinaus auch ohne Koadministration von Adjuvantien induziert werden.

Weiterhin haben die Studien ergeben, dass die Adjuvanseigenschaften von SfbI nicht von dem gesamten Protein abhängig, sondern vielmehr distinkten Regionen zu zuschreiben sind.

Diese Ergebnisse lassen erwarten, dass die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *S. pyogenes* und die Nutzung von SfbI für andere Vorhaben im Bereich der Impfstoffforschung erleichtert werden.

Ada, G. and Ramsay, A. (1996) in *Vaccines, Vaccination and the Immune Response*, S. 123

Ada, G. and Ramsay, A. (1996) in *Vaccines, Vaccination and the Immune Response*, S. 138

Adams W.G., Deaver, K.A., Cochi, S.L., Plikaytis, B.D., Zell, E.R., Broome, C.V., Wenger, J.D. (1993) Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 269:221-6

Agren, L.C., Ekman, L., Löwenadler, B. and Lycke, N. (1997) Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J. Immunol.* 158:3936-46

Ahmed, R. and Gray, D. (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60

Alonso, P.L., Tanner, M., Smith, T., Hayes, R.J., Schellenberg, J.A., Lopez, M.C., Bastos de Azevedo, I., Menendez, C., Lyimo, E., Weiss, N. (1994) A trial of the synthetic malaria vaccine SPf66 in Tanzania: rationale and design. *Vaccine* 12(2):181-6

Argos, P. (1990) An Investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J. Mol. Biol.* 211:943-958

Bachmann, M.F., Odermatt, B., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1996) Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J. Exp. Med.* 183:2259-69

Begg und Cutts (1994) in: Cutts, F.T., Smith, P.G., Eds. *Vaccination and World Health*. J. Wiley & Sons, Chichester, S. 123-137

Bergquist, C., Johansson, E-L, Lagergard, T., Holmgren, J. and Rudin, A. (1997) Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect. Immun.* 65:2676-84

Bessen, D. and Fischetti, V.A. (1988) Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci. *Infect. Immun.* 56:2666-72

Bisno, A.L. (1991) Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N. Engl. J. Med.* 325:783-93

Blanchard, T.G., Lycke, N., Czinn, S.J. and Nedrud, J.G. (1998) Recombinant cholera toxin B subunit is not an effective mucosal adjuvant for oral immunization of mice against *Helicobacter felis*. *Immunol.* 93:22-27

Brandt, E.R., Sriprakash, K.S., Hobb, R.I., Hayman, W.A., Zeng, W., Batzloff, M.R., Jackson, D.C., Good, M.F. (2000) New multi-determinant strategy for a group A streptococcal vaccine designed for the Australian Aboriginal population. *Nat.Med.* 6(4):455-9

- Brandt, E.R., Teh, T., Relf, W.A., Hobb, R.I. and Good, M.F.** (2000) Protective and nonprotective epitopes from amino termini of M proteins from Australian aboriginal isolates and reference strains of group A streptococci. *Infect. Immun.* 68:6587-94
- Braun, M.C., He, J., Wu, C.Y., Kelsall, B.L.** (1999) Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. *J. Exp. Med.* 189:541-552
- Brown, A., Hormaeche, C.E., Demarco de Hormaeche, R., Winther, M., Dougan, G., Maskell, D.J. and Stocker, B.A.D.** (1987) An attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice. *J. Infect. Dis.* 155:86-91
- Brown, F.** (1990) The potential of peptides as vaccines. *Semin. Virol.* 1:67-74
- Brumeanu, T.-D., Casares, S., Bot, A., Bot, S. and Bona, C.A.** (1997) Immunogenicity of a contiguous T-B synthetic epitope of the A/PR/8/34 influenza virus. *J. Virol.* 71:5473-80
- Buchmeier, N.A. and Heffron, F.** (1991) Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 59:2232-38
- Chacon, M.R., Londono, P., Dougan, G., Selkirk, M.E.** (1996) Heterologous expression of the cuticular-glutathione peroxidase of lymphatic filariae in an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* abrogates H-2 restriction of specific antibody responses. *Parasite Immunol.* 18:307-16
- Cornaglia, G., Ligozzi, M., Mazzariol, A., Valentini, M., Orefici, G., Fontana, R.** (1996) Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993-1995. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 2:339-42
- Coffman, R.L., Mosmann, T.R.** (1991) CD4+ T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Res. Immunol.* 142(1):7-9
- Corthésy and Spertini** (1999) Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol. Chem.* 380:1251-62
- Cox, J.H., Ivanyi, J., Young, D.B., Lamb, J.R., Syred, A.D. and Francis, M.J.** (1988) Orientation of epitopes influences the immunogenicity of synthetic peptide dimers. *Eur. J. Immunol.* 18:2015-19
- Cox, J.C. and Coulter, A.R.** (1997) Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15:248-56
- Cue, D., Southern, S.O., Southern, P.J., Prabhakar, J., Lorelli, W., Smallheer, J.M., Mousa, S.A., Cleary, P.P.** (2000) A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin alpha 5beta 1-fibronectin-M1 protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2858-63

- Cunningham, M.W., Antone, S.M., Smart, M., Liu, R., Kosanke, S.** (1997) Molecular analysis of human cardiac myosin-cross-reactive B- and T-cell epitopes of the group A streptococcal M5 protein. *Infect. Immun.* 65:3913-23
- Dagan, R., Eskola, J., Leclerc, C., Leroy, O.** (1998) Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infect Immun.* 66(5):2093-8.
- Dale, J.B., Beachey, E.H.** (1985) Epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac myosin. *J. Exp. Med.* 162:583-91
- Dale, J.B.** (1998) Group A streptococcal vaccines. *Pediatric. Ann.* 27(5):301-8
- Darji, A., Guzmán, C.A., Gerstel, B., Wachholz, P., Timmis, K.N., Wehland, J., Chakraborty, T. and Weiss, S.** (1997) Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 91:765-75
- Darji, A., zur Lage, S., Garbe, A.I., Chakraborty, T., Weiss, S.** (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27:341-9
- Davis, J.P., Chesney, P.J., Wand, P.J., LaVenture, M.** (1980) Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors, and prevention. *N. Engl. J. Med.* 303(25):1429-35.
- De Geus, B., Dol-Bosman, M., Scholten, J.W., Stok, W. and Bianchi, A.** (1997) A comparison of natural and recombinant cholera toxin B subunit as stimulatory factors in intranasal immunization. *Vaccine* 15:1110-3
- Del Giudice, G. and Rappuoli, R.** (1999) Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants. *Vaccine* 17(Suppl 2):S44-52
- De Quadras** (1994) in: Cutts F.T., Smith P.G., Eds. *Vaccination and World Health*. John Wiley & Sons, Chichester, S. 17-34
- Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S.H., Hess, J., Szalay, A.A., Goebel, W.** (1998) Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotechnol.* 16(2):281-5
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W. and Liu, M.A.** (1997) DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15:617-48
- Douce, G., Turcotte, C., Cropley, I., Roberts, M., Pizza, M., Domenghini, M., Rappuoli, R. and Dougan, G.** (1995) Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1644-8
- Dunne, M., al-Ramadi, B.K., Barthold, S.W., Flavell, R.A., Fikrig, E.** (1995) Oral vaccination with an attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing *Borrelia burgdorferi* OspA prevents murine Lyme borreliosis. *Infect. Immun.* 63:1611-4

- Dunstan, S.J., Simmons, C.P. and Strugnell, R.A.** (1998) Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. *Infect. Immun.* 66:732-740
- Elson, C.O., Holland, S.P., Dertzbaugh, M.T., Cuff, C.F., Anderson, A.O.** (1995) Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and its B subunit. *J. Immunol.* 154:1032-40
- Fairweather, N.F., Lyness, V.A. and Maskell, D.J.** (1987) Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55:2541-5
- Finlay, B.B. and Falkow, S.** (1989) Salmonella as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 3:1833-41
- Fitzmaurice, C.J., Brown, L.E., McInerney, T.L., Jackson, D.C.** (1996) The assembly and immunological properties of non-linear synthetic immunogens containing T-cell and B-cell determinants. *Vaccine* 14:553-60
- Frank, R.** (1992) Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-32
- Gauntt, C.J., Higdon, A.L., Arizpe, H.M., Tamayo, M.R., Crawley, R., Henkel, R.D., Pereira, M.E., Tracy, S.M., Cunningham, M.W.** (1993) Epitopes shared between coxsackievirus B3 (CVB3) and normal heart tissue contribute to CVB3-induced murine myocarditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68:129-34
- Gibofsky, A. and Zabriskie, J.B.** (1995) Rheumatic fever and poststreptococcal reactive arthritis. *Curr. Opin. Rheum.* 7:299-305
- Guilherme, L, Cunha-Neto, E., Coelho, V., Snitcowsky, R., Pomerantzeff, P.M., Assis, R.V., Pedra, F., Neumann, J., Goldberg, A., Patarroyo, M.E., *et al.*** (1995) Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* 92:415-20
- Guzmán, CA, Talay SR, Molinari G, Medina E, Chhatwal GS.** (1999) Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI. *J. Infect. Dis.* 179:901-6
- Guzmán, C.A., Weiss, S., Chakraborty, T.** (1997) in: Well, J., Pozzi, G., Eds. *Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicles for Mucosal Immunization*, Biotechnology Intelligence Unit series. Georgetown, TX, USA: Landes Biomedical Publishers, S. 145-73
- Haidan, A, Talay, S.R., Rohde, M., Sriprakash, K.S., Currie, B.J., Chhatwal, G.S.** (2000) Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an Aboriginal population. *Lancet* 356:1167-69
- Iizawa, Y. and Czupurynski, C.** (1992) Effects of administration of murine recombinant IL-4 on the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Lett.* 32:185-90

- Isaka, M., Yasuda, Y., Mizokami, M., Kozuka, S., Taniguchi, T., Matano, K., Maeyama, J.-I., Mizuno, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikubo, K.** (2001) Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 19:1460-6
- Jameson, B.A. and Wolf, H.** (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS* 4(1):181-186
- Jenkinson, H.F. and Lamont, R.J.** (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 8:175-200
- Ji, Y., Carlson, B., Kondagunta, A., Cleary, P.P.** (1997) Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* 65:2080-7
- Johnson, D.R., Stevens, D.L., Kaplan, E.L.** (1992) Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J. Infect. Dis.* 166:374-82
- Jones B.D., Ghorri, N. and Falkow, S.** (1994) *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180:15-23
- Kaplan, E.L.** (1991) The resurgence of group A streptococcal infections and their sequelae. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:55-57
- Kapur, V., Maffei, J.T., Greer, R.S., Li, L.L., Adams, G.J., Musser, J.M.** (1994) Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. *Microb. Pathog.* 16:443-50
- Karem, K.L., Bowen, J., Kuklin, N., Rouse, B.T.** (1997) Protective immunity against herpes simplex virus (HSV) type 1 following oral administration of recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strains expressing HSV antigens. *J. Gen. Virol.* 78(Pt2):427-34
- Kim, P.-H., Eckmann, L., Lee, W.J., Han, W., Kagnoff, M.F.** (1998) Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF-beta 1. *J Immunol.* 160:1198-1203
- Lamm, M.E.** (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:311-40
- Lanzavecchia, A.** (1993) Identifying strategies for immune intervention. *Science* 260 (5110):937-44
- Lai, W.C. and Bennett, M.** (1998) DNA vaccines. *Crit. Rev. Immunol.* 18:449-84

- LaPenta, D., Rubens, C., Chi, E., Cleary, P.P.** (1994) Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12115-9
- Li, T.-K. und Fox, B.S.** (1996) Cholera toxin B subunit binding to an antigen-presenting cell directly co-stimulates cytokine production from a T cell clone *Int Immunol* 8(12):1849-56
- Locksley, M. and Louis, J.A.** (1992) Immunology of leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* 4:413-8
- London, C.A., Abbas, A.K., Kelso, A.** (1998) Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63(1-2):37-44
- Lycke, N. and Holmgren, J.** (1986) Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunol.* 59:301-308
- Manjula, B.N., Trus, B.L., Fischetti, V.A.** (1985) Presence of two distinct regions in the coiled-coil structure of the streptococcal Pep M5 protein: relationship to mammalian coiled-coil proteins and implications to its biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1064-8
- Manz, R.A., Thiel, A. and Radbruch, A.** (1997) Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133-4
- Medina, E., Talay, S.R., Chhatwal, G.S., Guzmán, C.A.** (1998) Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* promotes T cell-independent proliferation of murine B lymphocytes and enhances the expression of MHC class II molecules on antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 10(11):1657-64
- Medina, E., Talay, S., Chhatwal, G.S. and Guzmán, C.A.** (1998) Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route. *Eur. J. Immunol.* 28:1069-77
- Medina, E., Molinari, G., Rohde, M., Haase, B., Chhatwal, G.S., Guzmán, C.A.** (1999) Fc-mediated nonspecific binding between fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* and human immunoglobulins. *J. Immunol.* 163:3396-402
- Medina, E., Guzmán, C.A., Staendner, L.H., Colombo, M.P. and Paglia P.** (1999) Salmonella vaccine carrier strains: effective delivery system to trigger anti-tumor immunity by oral route. *Eur. J. Immunol.* 29:693-9
- Medina, E., Paglia, P., Nikolaus, T., Müller, A., Hensel, M., Guzmán, C.A.** (1999) Pathogenicity Island 2 Mutants of *Salmonella typhimurium* Are Efficient Carriers for Heterologous Antigens and Enable Modulation of Immune Responses. *Infect. Immun.* 67(3):1093-99
- Medina, E., Schulze, K., Chhatwal, G.S., Guzmán, C.A.** (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')(2) fragment. *Infect. Immun.* 68(8):4786-8
- Minekawa, Y., Ueda, S., Yamanishi, K., Ogino, T., Takahashi, M., Okuno, Y.** (1974) Studies on live rubella vaccine V. *Biken Journal.* 17:161-167

- Molinari, G., Talay, R.S., Valentin-Weigand, P., Rohde, M. and Chhatwal, G.S.** (1997) The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalisation of group A streptococci by epithelial cells. *Infect. Immun.* 65:1357-1363.
- Munoz, E., Zubiaga, A.M., Merrow, M., Sauter, N.P., Huber, B.T.** (1990) Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 172:95-103
- Murphy, F.A.** (1994) New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv. Virus Res.* 43:1-52
- Nardelli-Haeffliger, D., Roden, R.B., Benyacoub, J., Sahli, R., Kraehenbuhl, J.P., Schiller, J.T., Lachat, P., Potts, A., De Grandi, P.** (1997) Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect. Immun.* 65:3328-36
- Nardin, E.H., Oliveira, G.A., Calvo-Calle, J.M., Nussenzweig, R.** (1995) The use of multiple antigen peptides in the analysis and induction of protective immune responses against infectious diseases. *Adv. Immunol.* 50:105-50
- Nauciel, C.** (1990) Role of CD4⁺ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol.* 145(4):1265-9
- Neu, H.C.** (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257:1064-73
- Ochsenbein, A.F., Pinschewer, D.D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M.** (2000) Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13263-8
- Oggioni, M.R., Manganelli, R., Contorni, M., Tommasino, M., Pozzi, G.** (1995) Immunization of mice by oral colonization with live recombinant commensal streptococci. *Vaccine* 13:775-9
- Olsen, A.W., Hansen, P.R., Holm, A. and Andersen, P.** (2000) Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen. *Eur. J. Immunol.* 30:1724-32
- Paglia, P., Medina, E., Arioli, I., Guzmán, C.A. and Colombo, M.P.** (1998) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 10:46-56
- Paglia, P., Terrazzini, N., Schulze, K., Guzmán, C.A. and Colombo, M.P.** (2000) In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 7(20):1725-30
- Parditos, C., Stanley, C., Steward, M.** (1992) The effect of orientation of epitopes on the immunogenicity of chimeric synthetic peptides representing measles virus protein sequences. *Mol. Immunol.* 29:651-8

- Pichichero, M.E.** (1998) Group A beta-hemolytic streptococcal infections. *Pediatr. Rev.* 19:291-302
- Pope, M., Kotlarski, I., Doherty, K.** (1994) Induction of Lyt-2+ cytotoxic T lymphocytes following primary and secondary Salmonella infection. *Immunology* 81(2):177-82
- Pruksakorn, S., Galbraith, A., Houghten, R.A. and Good, M.F.** (1992) Conserved T and B cell epitopes on the M protein of group A streptococci. Induction of bactericidal antibodies. *J. Immunol.* 149:2729-35
- Pruksakorn, S., Currie, B., Brandt, E., Phornphutkul, C., Hunsakunachai, S., Manmontri, A., Robinson, J.H., Kehoe, M.A., Galbraith, A., Good, M.F.** (1994) Identification of T cell autoepitopes that cross-react with the C-terminal segment of the M protein of group A streptococci. *Int. Immunol.* 6:1235-44
- Roberts, M., Bacon, A., Rappuoli, R., Pizza, M., Cropley, I., Douce, G., Dougan, G., Marinaro, M., McGhee, J. and Chatfield, S.** (1995) A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect. Immun.* 63:2100-8
- Romagnani S.** (1991) Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* 21(2):152-8
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: Cold Harbor Laboratory Press.
- Sanger, J.M., Chang, R., Ashton, F., Kaper, J.B., Sanger, J.W.** (1996) Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 34(4):279-87
- Schittek, B. and Rajewsky, K.** (1990) Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346:749-51
- Schorr, J., Knapp, B., Hundt, E., Küpper, H.A., Amann, E.** (1991) Surface expression of malarial antigens in *Salmonella typhimurium*: induction of serum antibody response upon oral vaccination of mice. *Vaccine* 9:675-81
- Simmons, C.P., Hussell, T., Sparer, T., Walzl, G., Openshaw, P. and Dougan, G.** (2001) Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. *J. Immunol.* 166:1106-13
- Sizemore, D.R., Branstrom, A.A. and Sadoff, J.C.** (1995) Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270:299-302
- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K. and Ahmed, R.** (1998) Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8:363-72
- Sory, M.P., Hermand, P., Vaerman, J.P., Cornelis, G.R.** (1990) Oral immunization of mice with a live recombinant *Yersinia enterocolitica* O:9 strain that produces the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* 58:2420-8

- Spiegel, S.** (1990) Cautionary note on the use of the B subunit of cholera toxin as a ganglioside GM1 probe: detection of cholera toxin A subunit in B subunit preparations by a sensitive adenylate cyclase assay. *J. Cell. Biochem.* 42:143-52
- Sprent, J. and Tough, D.F.** (1994) Lymphocyte life-span and memory. *Science* 265:1395-400
- Sprent, J.** (1994) T and B memory cells. *Cell* 76:315-22
- Steinhoff, U., Müller, U., Schertler, A., Hengartner, H., Aguet, M. and Zinkernagel, R.M.** (1995) Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *J. Virol.* 69:2153-8
- Stevens, D.L.** (1995) Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg. Infect. Dis.* 1:69-78
- Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., Vitetta, E.S.** (1988) Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334(6179):255-8
- St Geme, J.W.** (1997) Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. *Adv. Pediatr.* 44:43-72
- Street, N.E., Mosmann, T.R.** (1991) Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 5(2):171-7
- Strober, W., Kelsall, B., Marth, T.** (1998) Oral tolerance. *J. Clin. Immunol.* 18:1-30
- Su, G.F., Brahmabhatt, H.N., de Lorenzo, V., Wehland, J., Timmis, K.N.** (1992) Extracellular export of Shiga toxin B-subunit/haemolysin A (C-terminus) fusion protein expressed in *Salmonella typhimurium* aroA-mutant and stimulation of B-subunit specific antibody responses in mice. *Microb. Pathog.* 13:465-76
- Talay, S.R., Ehrenfeld, E., Chhatwal, G.S., Timmis, K.N.** (1991) Expression of the fibronectin-binding components of *Streptococcus pyogenes* in *Escherichia coli* demonstrates that they are proteins. *Mol. Microbiol.* 5:1727-34
- Talay, S.R., Valentin-Weigand, P., Jerlstrom, P.G., Timmis, K.N., Chhatwal, G.S.** (1992) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect. Immun.* 60:3837-44
- Talay, S.R., Valentin-Weigand, P., Timmis, K.N., Chhatwal, G.S.** (1994) Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein, the fibronectin-binding adhesin of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 13(3):531-9
- Talay, S.R., Zock, A., Rohde, M., Molinari, G., Oggioni, M., Pozzi, G., Guzmán, C.A., Chhatwal, G.S.** (2000) Co-operative binding of human fibronectin to Sfb protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cel. Microbiol.* 2(6):521-35
- Taylor, M.K. and Cohen, J.J.** (1992) Cell-mediated cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* 4:338-343

- Turner S.J., Carbone, F.R. and Strugnell, R.A.** (1993) *Salmonella typhimurium* delta *aroA* delta *aroD* mutants expressing a foreign recombinant protein induce specific major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice. *Infect. Immun.* 61:5374-80
- Tzschaschel, B.D., Guzmán, C.A., Timmis, K.N., de Lorenzo, V.** (1996) An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium aroA*. *Nat. Biotechnol.* 14(6):765-9
- Tzschaschel, B.D., Klee, S.R., de Lorenzo, V. Timmis, K.N. and Guzman, C.A.** (1996) Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri aroD* carrier strain. *Microb. Pathog.* 21:277-88
- Valentin-Weigand, P., Talay, S.R., Kaufhold, A., Timmis, K.N., Chhatwal, G.S.** (1994) The fibronectin binding domain of the Sfb protein adhesin of *Streptococcus pyogenes* occurs in many group A streptococci and does not cross-react with heart myosin. *Microb. Pathog.* 17:111-120
- Valero, M.V., Amador, L.R., Galindo, C. Figueroa, J., Bello, M.S., Murillo, L.A., Mora, A.L., Patarroyo, G., Rocha, C.L., Rojas, M., et al.,** (1993) Vaccination with SPf66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum malaria* in Colombia. *Lancet* 341(8847):705-10
- Verma, N.K., Ziegler, H.K., Wilson, M., Khan, M., Safley, S., Stocker, B.A., Schoolnik, G.K.** (1995) Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated Salmonella. *Vaccine* 13:142-50
- Vogel, F.R.** (2000) Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin. Infect. Dis.* 30(Suppl3):266-70
- Vordermeier, H.-M., Harris, D.P., Moreno, C., Singh, M. and Ivanyi, J.** (1995) The nature of the immunogen determines the specificity of antibodies and T cells to selected peptides of the 38 kDa mycobacterial antigen. *Int. Immunol.* 7:559-66
- Wang, C.W., Looney, D.J., Li, M.L., Walfield, A.M., Ye, J., Hosein, B., Tam, J.P., Wong-Staal, F.** (1991) Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen. *Science* 254:285-8
- Weiner, H.L.** (1997) Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today.* 18:335-343
- Wizemann, T.M., Adamou, J.E., Langermann, S.** (1999) Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 5(3):395-403
- Woogen, S.D., Ealding, W., Elson, C.O.** (1987) Inhibition of murine lymphocyte proliferation by the B subunit of cholera toxin. *J. Immunol.* 139:3764-70
- Woogen, S.D., Turo, K., Dieleman, L.A., Beagley, K.W., Elson, C.O.** (1993) Inhibition of murine T cell activation by cholera toxin B subunit is not mediated through the phosphatidylinositol second messenger system. *J. Immunol.* 150:3274-83

Wu, H-Y. and Russell, M.W. (1998) Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 16:286-292

Yamamoto, S., Takeda, Y., Yamamoto, M., Kurazono, H., Imaoka, K., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Noda, M., Kiyono, H. and McGhee, J.R. (1997) Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrheagenicity but retain adjuvanticity. *J. Exp. Med.* 185:1203-10

Zhang, J.R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M., Tuomanen, E. (2000) The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell.* 102(6):827-37.

Zegers, N.D., Kluter, E., Van Der Stap, H., Van Dura, E., Van Dalen, P., Shaw, M., Baillie, L. (1999) Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *J. Appl. Microbiol.* 87:309-14

| | |
|---------------|---|
| A | Ampère |
| Abb. | Abbildung |
| Abs | Absorption |
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure)-Diammonium-Salz |
| ACK-Puffer | Amoniumchlorid-Puffer |
| ADCC | antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität |
| Amp | Ampicillin |
| AMS | Aminosäuren |
| APC | antigenpräsentierende Zellen |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| β-Gal | β-Galaktosidase |
| bp | Basenpaare |
| B-PER™ | Bacterial Protein Extraction Reagent |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| Ci | Curi |
| Cm | Chloramphenicol |
| cpm | Zähler pro Minute |
| CT | Choleratoxin |
| CTB | Choleratoxin B-Untereinheit |
| CTL | zytotoxische T-Lymphocyten |
| CTR | Kontrolle |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme linked Immunosorbant Assay |
| <i>et al.</i> | <i>et alteri</i> |
| FCS | fötales Kälberserum |
| g | Gramm |
| GAS | Gruppe A Streptokokken |
| GMT | geometrischen Mittelwertes des Endpunkttiters |
| GS-Linker | Glycerin-Serin-Linker |
| h | Stunde |
| His-Tag | Histidin-Schwanz |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| i.d.R. | in der Regel |
| IFN-γ | Interferon γ |
| IgA/G/M | Immunglobulin A, G bzw. M |
| IL | Interleukin |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| KBE | koloniebildende Einheiten |
| Km | Kanamycin |
| kb | Kilobasen |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |

| | |
|--------------------|--|
| Log ₂ | Logarithmus zur Basis 2 |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| μ | mikro |
| min | Minuten |
| M | molar |
| m | milli |
| m | Meter |
| n | nano |
| OD | Optische Dichte |
| Ova | Ovalbumin |
| P | Wahrscheinlichkeit |
| p | pico |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunden |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SfbI | Fibronektin Bindungsprotein I |
| SI | Stimulationsindex |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris/Acetat-EDTA |
| TBS | Tris-gepufferte Saline |
| TBS-T | Tris-gepufferte Saline mit 0,1% Tween20 |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGF-β ₁ | transformierender Wachstumsfaktor-β ₁ |
| THY | Todd-Hewitt Yeast |
| T _m | Schmelztemperatur |
| U | Einheiten |
| UV | Ultraviolett |
| Ü/N-Kultur | Über-Nacht-Kultur |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| W | Watt |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung |

| | |
|---|----|
| Abb. 1: A) Darstellung der weltweit häufigsten Todesursachen in dem Jahr 1997.....7 (modifiziert nach World Health Report 1998; WHO/OMS). B) Darstellung der häufigsten, zum Tode führenden Infektionskrankheiten (Daten des World Health Reports 2000; WHO/OMS). | 7 |
| Abb. 2: Darstellung antibakterieller Resistenzen anhand dreier Beispiele8 (modifiziert nach WHO Report on Infectious Diseases 1999 und 2000; WHO/CDS/99.1, WHO/CDS/2000.2). | 8 |
| Abb. 3: Pathogenese von Infektionen mit <i>S. pyogenes</i> (modifiziert nach9 M.J. Patterson, Graduate School of Biomedical Sciences at UTMB) | 9 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung des Fibronektin-Bindungsproteins SfbI von.....13 <i>S. pyogenes</i> . | 13 |
| Abb. 5: Markierungsschema der Mäuse. Die Ohren der Tiere wurden mit einer Zange.....32 gelocht. | 32 |
| Abb. 6: Blutabnahme aus der Schwanzvene 32 | 32 |
| Abb. 7: Mausanatomie, Lokalisation der Lymphknoten (modifiziert von <i>Current 33</i> <i>Protocols in Immunology</i>) | 33 |
| Abb. 8: ELISA-Tests: (A) Standard-ELISA zur Bestimmung spezifischer Antikörper..... 38 (B) ELISA zur Bestimmung spezifischer Antikörper gegen Peptide. Ag = Antigen; Ak = Antikörper; B = Biotin; PO = Peroxidase; spAk = spezif. Antikörper | 38 |
| Abb. 9: Protein SfbI und dessen Derivate 40 | 40 |
| Abb.10: Kontrolle der aufgefundenen Fraktionen mittels Coomassie-Färbung (links)..... 41 und Western-Blot Analyse (rechts) am Beispiel H2. | 41 |
| Abb.11: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch42 die SfbI-Derivate. | 42 |
| Abb.12: IgG-Isotypen-Muster der durch die SfbI-Derivate hervorgerufenen spezifischen,43 humoralen Immunantwort. | 43 |
| Abb.13: Antigenspezifische IgA in Lungenwaschungen aus Mäusen.....43 | 43 |
| Abb.14: Zelluläre Immunantwort nach Immunisierung mit SfbI-Derivaten44 | 44 |
| Abb.15: Impfschutz durch SfbI-Derivate nach intranasaler Immunisierung gegen eine.....45 Infektion mit einem heterologen <i>S. pyogenes</i> Stamm. | 45 |
| Abb.16: Antigenspezifische IgG-Bildung nach Stimulation durch das SfbI-Derivat H2.....46 | 46 |
| Abb.17: Antigenspezifische IgG ca. drei Wochen bzw. dreieinhalb Monate nach46 Stimulation durch das SfbI-Derivat H12. | 46 |

| | |
|---|----|
| Abb.18: IgG-Isotypen-Muster der durch das SfbI-Derivat H12 hervorgerufenen Antikörper drei Monate nach der Immunisierung. | 47 |
| Abb.19: Spezifische IgA für die fibronectinbindende Domäne H12 in Lungenwaschungen aus Mäusen drei Wochen bzw. drei Monate nach intranasaler Immunisierung. | 48 |
| Abb.20: Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort | 49 |
| Abb.21: Impfschutz durch das SfbI-Derivat H12 25 und 110 Tage nach intranasaler Immunisierung. | 49 |
| Abb.22: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch das SfbI-Derivat H12 ohne gleichzeitiger Gabe des Adjuvans CTB. | 50 |
| Abb.23: IgG-Isotypen-Muster der durch das SfbI-Derivat H12 hervorgerufenen spezifischen, humoralen Immunantwort ohne (links) und mit mukosalem Adjuvans CTB (rechts). | 51 |
| Abb.24: Antigenspezifische IgA in Lungenwaschungen aus Mäusen, die mit der Fibronectin-Bindungsdomäne (H12) allein (links) oder zusammen mit CTB (rechts) immunisiert wurden. | 51 |
| Abb.25: Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit und ohne dem mukosalen Adjuvans CTB. | 52 |
| Abb.26: Impfschutz durch das SfbI-Derivat H12 25 bzw. 110 Tage nach intranasaler Immunisierung ohne mukosalem Adjuvans CTB. | 53 |
| Abb.27: IgG-Isotypen-Muster der durch die Fibronectin-Bindungsdomäne H12 hervorgerufenen spezifischen Immunantwort in den congenen Mausstämmen BALB/c, BALB/b und BALB/k. | 55 |
| Abb.28: Identifizierung von B-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI mittels ELISA. | 56 |
| Abb.29: Identifizierung von B-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI bei dem congenen Mausstamm BALB/b mittels ELISA (A) und Antigenbindungstest (B+C). | 57 |
| Abb.30: Identifizierung von B-Zellepitopen innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI bei dem congenen Mausstamm BALB/k mittels ELISA (A) und Antigenbindungstest (B+C). | 59 |
| Abb.31: Für das Epitop-Mapping der fibronectinbindenden <i>Repeats</i> eingesetzte Peptide. | 59 |
| Abb.32: Sequenzen der membrangekoppelten Peptide zur Identifizierung der B-Zellepitope innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI mittels des Antikörperbindungstests (II 7.3.8). | 60 |

| | |
|---|----|
| Abb.33: Vorhersage potentieller B-Zellepitope in den fibronectinbindenden <i>Repeats</i> 61 nach Jameson-Wolf (1988) mittels des Programms PROTEAN der Firma DNASTAR. | 61 |
| Abb.34: Proliferations-Assay zur Identifizierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der 62 Fibronectin-Bindungsdomäne (H12). | 62 |
| Abb.35: Proliferations-Assays zur Identifizierung der proliferierenden Zellpopulation 63 nach Deletion von B-Zellen (A) bzw. CD4 ⁺ -T-Zellen (B). | 63 |
| Abb.36: Klonierung von Ovalbumin in die Expressionsvektoren pSTH2, pSTH10 und 65 pSTH12. | 65 |
| Abb.37: Überprüfung der Insertionsrichtung des Ovalbumin-Gens in pSTH2 65 (A, Bahn 1-6), pSTH10 (A, Bahn 7-12) und pSTH12 (B, Bahn 1-12) durch Restriktion mit <i>Pst</i> I. | 65 |
| Abb.38: Sequenz der Fusionsproteine bestehend aus His-Tag (fett), Ovalbumin (rot), 67 GS-Linker (grün) und einem SfbI-Derivat am Beispiel H2 (blau). | 67 |
| Abb.39: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch die 67 Fusionsproteine. | 67 |
| Abb.40: Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit 68 verschiedenen His-Tag-Fusionsproteinen bestehend aus dem Modellantigen Ova und einem SfbI-Derivat. | 68 |
| Abb.41: Kinetik der antigenspezifischen IgG Bildung nach Stimulation durch 69 Koadministration von β -Gal und der SfbI-Derivate H2, H10 oder H12. | 69 |
| Abb.42: IgG-Isotypen-Muster der durch Vakzinierung mit β -Gal koadministriert mit 70 den SfbI-Derivaten H2, H10 oder H12 hervorgerufenen spezifischen, humoralen Immunantwort. | 70 |
| Abb.43: Antigenspezifische IgA in Lungenwaschungen aus Mäusen, die mit β -Gal 71 allein und zusammen mit einem SfbI-Derivat vakziniert wurden. | 71 |
| Abb.44: Antigenspezifische, zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit β -Gal 72 und β -Gal koadministriert mit einem SfbI-Derivat. | 72 |
| Abb.45: Klonierung der kodierenden Sequenz für das SfbI-Derivat H12 in den 74 Expressionsvektor pVDL9.3 | 74 |
| Abb.46: Klonierung von Cytokinen in die Expressionsvektoren pBK-CMV, pCMV- β 76 und pcDNA3 anhand der Beispiele IL-2 (pKSC24), TGF- β (pKSC26) und IL-12 (pKSC27). | 76 |
| Abb.47: Korrektur des Gendefekts in INF- γ -defizienten Mäusen (GKO) 77 | 77 |

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Humanpathogene, gegen die Impfstoffe entwickelt wurden 10 (Daten der WHO entnommen). | 10 |
| Tab. 2: Verwendete Bakterienstämme 15 | 15 |
| Tab. 3: Verwendete eukaryontische Zelllinien 15 | 15 |
| Tab. 4: Verwendete Tiere 15 | 15 |
| Tab. 5: Verwendete Plasmide 15 | 15 |
| Tab. 6: Verwendete Chemikalien 16 | 16 |
| Tab. 7: Verwendete Membranen 17 | 17 |
| Tab. 8: Verwendete Enzyme 17 | 17 |
| Tab. 9: Verwendete Kits 17 | 17 |
| Tab.10: Verwendete kommerziell erwerbbaare Antikörper und Seren 18 | 18 |
| Tab.11: Verwendete Oligonukleotide 19 | 19 |
| Tab.12: Verwendete Antibiotika 20 | 20 |
| Tab.13: Peptide zur Identifizierung der B- und T-Zellepitope innerhalb der Fibronectin-..... 54 Bindungsrepeats des Proteins SfbI. | 54 |
| Tab.14: Sequenzen der membrangebundenen Peptide zur Identifizierung der 54 B-Zellepitope innerhalb der Fibronectin-Bindungsrepeats des Proteins SfbI mittels des Antikörperbindungstests (II 7.3.8). | 54 |
| Tab.15: Vorhersage von MHC II-Motiven für Mäuse des Haplotyps IA ^k und für 63 den menschlichen Haplotyp HLA-DRB1 *0401 (DR4Dw4) mittels des Algorithmus' SYFPEITHI nach Rammensee <i>et al.</i> (1999). | 63 |
| Tab.16: Einige Cytokine und ihre Wirkungen 74 | 74 |

Danksagungen

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Impfstoffforschung der Abteilung Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung, Bereich Mikrobiologie der GBF Braunschweig durchgeführt.

Ich danke meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis, für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit anfertigen zu können. Ferner danke ich ihm für die Übernahme des Referates.

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. Dr. Carlos A. Guzmán, der die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Ich bedanke mich für seine Unterstützung, seine Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Diskussionen.

Frau Dr. Eva Medina gilt mein großer Dank für ihre Hilfe bei den Immunisierungsstudien und den vielen intensiven Diskussionen rund um die Immunologie.

Astrid und Bianka danke ich für ihre Hilfestellungen und für das sehr freundliche Laborleben. Ohne die aufbauenden Worte und die vielen persönlichen Gespräche hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht. In diesem Sinne danke ich auch Antonia, die uns durch ihr fröhliches Wesen immer wieder zum Lachen gebracht hat.

Danken möchte ich auch Andreas für seine Hilfsbereitschaft über meine Diplomarbeit hinaus.

Frau Dr. Susanne R. Talay danke ich für die fachkundigen Diskussionen über SfbI. Ferner danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität für die hilfsbereite Unterstützung und die schöne Zeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums der Biologie.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau Kathrin, die mich immer begleitet und täglich unterstützt hat. Ihre Fürsorge war immer sehr kraftspendend.